

BEST AVAILABLE COPY

BK

JP2000287692 A

**CONTROL OF CONTENT OF SUGAR CHAIN HAVING DIFFERENT
BRANCHING NUMBERS IN THE COMPOSITION OF N-BOUND SUGAR CHAIN
CONTAINED IN GLYCOPROTEIN
MITSUI CHEMICALS INC KIRIN BREWERY CO LTD**

Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing glycoprotein having controlled or modified branching composition of sugar chain (ratio of sugar chain having different branching numbers to total sugar chain) by controlling the branching structure which is the skeletal structure of added N-bound sugar chain in glycoprotein produced by a eukaryote intracellularly and extracellularly. **SOLUTION:** This method comprises controlling the content of sugar chain having different branching numbers in N-bound sugar chain which is added to glycoprotein produced by a eukaryote by regulating the relative activity of β -1,4-galactose transferase to the activity of β -1,4-N-acetylglucosamine transferase IV and/or β -1,6-N-acetylglucosamine transferase V by controlling the expression amount of the gene coding for β -1,4-galactose transferase in an eukaryotic cell capable of producing glycoprotein having N-bound sugar chain.

Inventor(s):

FUKUDA KAZUHIRO
TANIGAWA MINEKO
MAKINO TADASHI
MINOWA MARI
TAKEUCHI MAKOTO

Application No. 11103133 JP11103133 JP, **Filed** 19990409, **A1 Published** 20001017

Int'l Class: C12N01509

A61K03821 C12P01928 C12P02102 C12N00510 C12N00910
C12P02102 C12R00191

Patents Citing This One (1):

- WO2002057468 A2 20020725 THE DOW CHEMICAL COMPANY
METHOD FOR SECRETORY PRODUCTION OF
GLYCOPROTEIN HAVING HUMAN-TYPE SUGAR
CHAIN USING PLANT CELL

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-287692

(P2000-287692A)

(43) 公開日 平成12年10月17日 (2000. 10. 17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-ブ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/21		C 1 2 P 19/28	4 B 0 5 0
C 1 2 P 19/28		21/02	F 4 B 0 6 4
21/02		C 1 2 N 9/10	4 B 0 6 5
// C 1 2 N 5/10		A 6 1 K 37/66	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-103133
 (22) 出願日 平成11年4月9日 (1999. 4. 9)

(71) 出願人 000005887
 三井化学株式会社
 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号
 (71) 出願人 000253503
 麒麟麦酒株式会社
 東京都中央区新川二丁目10番1号
 (72) 発明者 福田 一弘
 千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式
 会社内
 (74) 代理人 100088328
 弁理士 金田 暢之 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖タンパク質の有するN-結合型糖鎖の組成中、分岐数が異なる糖鎖の含有割合を制御する方法

(57) 【要約】

【課題】 真核細胞が細胞内外に産生する糖タンパク質において、付加されるN-結合型糖鎖の骨格構造である分岐構造を制御し、糖鎖の分岐組成（分岐数が異なる糖鎖の、糖鎖全体に占める割合）の制御または改変された糖タンパク質を製造する方法を提供すること。

【解決手段】 N-結合型糖鎖を有する糖タンパク質を産生し得る真核細胞における β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を制御して、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素I V及び/または β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を調節することによって、該真核細胞から産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖における分岐数が異なる糖鎖の含有割合を制御する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 真核細胞により産生される糖タンパク質の有するN-結合型糖鎖の組成中の分岐数が異なる糖鎖の含有割合の制御方法であって、N-結合型糖鎖を有する糖タンパク質を産生し得る真核細胞における β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を制御し、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの少なくとも一方の活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を調節することによって、該真核細胞から産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数が異なる糖鎖の含有割合を制御することを特徴とする制御方法。

【請求項2】 前記真核細胞での β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を増加させ、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの少なくとも一方の活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を増加させることによって、該真核細胞により産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数の多い糖鎖の含有割合を減少させる請求項1に記載の制御方法。

【請求項3】 前記真核細胞での β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を減少させ、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの少なくとも一方の活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を減少させることによって、該真核細胞により産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数の多い糖鎖の含有割合を増加させる請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記糖タンパク質がインターフェロン γ である請求項1~3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 前記真核細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞株に由来するものである請求項1~4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 真核細胞にN-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質を産生させることによる糖タンパク質の製造方法であって、

(a) N-結合型糖鎖を有する糖タンパク質を産生し得る真核細胞における β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を制御して、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの少なくとも一方の活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を調節することによって、該真核細胞が産生する糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数が異なる糖鎖の含有割合を制御する工程と、

(b) 該真核細胞を培地で培養して、N-結合型糖鎖の

組成中における分岐数が異なる糖鎖の含有割合が制御された糖タンパク質を該真核細胞の内部または該培地中に生産させる工程と、

(c) 該真核細胞の内部または該培地に産生された糖タンパク質を回収する工程とを有することを特徴とする糖タンパク質の製造方法。

【請求項7】 前記真核細胞での β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を増加させ、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの少なくとも一方の活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を増加させることによって、該真核細胞により産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数の多い糖鎖の含有割合を減少させる請求項6に記載の製造方法。

【請求項8】 前記真核細胞での β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を減少させ、 β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素Vの少なくとも一方の活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素の相対活性を減少させることによって、該真核細胞により産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数の多い糖鎖の含有割合を増加させる請求項6に記載の製造方法。

【請求項9】 前記糖タンパク質がインターフェロン γ である請求項6~8のいずれかに記載の製造方法。

【請求項10】 前記真核細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞株に由来するものである請求項6~9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 N-結合型糖鎖における分岐数の異なる糖鎖の含有割合が改変されている糖タンパク質。

【請求項12】 請求項6~10のいずれかに記載の製造方法により得られた請求項11に記載の糖タンパク質。

【請求項13】 請求項11または12に記載の糖タンパク質を有効成分として含有することを特徴とする医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は糖タンパク質のN-結合型糖鎖の組成中における分岐数の異なる糖鎖の含有割合を制御する技術に関する。詳しくは、N-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質を細胞内外に産生し得る真核細胞での β -1, 4-ガラクトース転移酵素(GalT)遺伝子の発現量を制御して、該細胞内での β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV(GnT-IV)及び/または β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)の活性に対するGalTの相対活性を調節することによって、産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数が

異なる糖鎖の含有割合を制御する糖鎖構造の制御方法に関する。本発明は更に該制御方法を用いた分岐数の異なる糖鎖の含有割合が制御または改変された糖タンパク質の製造方法、該製造方法により得られた糖タンパク質及び該糖タンパク質を有効成分とする医薬製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】1980年代からの分子生物学の進展により、遺伝子工学を応用して、本来生体内に微量しか存在しないタンパク質を、外来タンパク質として組換え体大腸菌に大量に生産させることが可能になった。この技術により、ヒト体内に存在する生理活性物質のいくつかがバイオ医薬品として上市されている。しかし、大腸菌を宿主として生産したタンパク質の中には生理活性を示さないものがあることがわかっている。その原因のひとつとしては、天然のタンパク質の中には糖鎖が付加された糖タンパク質として存在するものがあるのに対して、大腸菌で生産されるタンパク質には糖鎖が付加されない点が考えられている。

【0003】当初、糖鎖はタンパク質の単なる飾り程度にしか認識されていなかったが、上記のような経緯から、それまで重視されていなかった糖タンパク質の糖鎖部分の重要性が浮上するに至った。タンパク質に付加される糖鎖の生理的役割は完全には解明されていないが、糖鎖生物学の急速な進歩により、糖鎖の役割が徐々に解明されつつある。このような背景から、タンパク質に付加される糖鎖の重要性がますます注目を浴びている。

【0004】糖タンパク質の糖鎖の機能については、エリスロポエチンにおいて、付加される糖鎖の構造と薬効の関係が知られている。すなわち、分岐数の多い特定の構造の糖鎖が付加されたエリスロポエチンが高い薬効を示すことが報告されている (Takeuchi, M. and Kobata, A., *Glycobiology* vol. 1, 337-346 (1991))。

【0005】従って、タンパク質に付加される糖鎖の構造を制御・改変し、糖鎖の機能を積極的に応用することができれば、医薬品等への応用が期待でき、産業上有用な技術になることが予想される。

【0006】遺伝子工学を利用してタンパク質を生産するにあたって、初期に用いられていたような大腸菌などの原核生物を宿主とした場合は、タンパク質に糖鎖が付加されることはない。また、酵母や昆虫細胞などの、ヒトと遠縁の真核生物を宿主とした場合は、タンパク質に付加される糖鎖が動物細胞のものとは大きく異なることが知られている。そのため、現在は、ヒト由来の血中酵素類、サイトカイン類など、糖鎖の付加が機能発現に必要な糖タンパク質の生産では、宿主として動物細胞が多く利用されるに至っている。

【0007】動物細胞内でのタンパク質への糖鎖付加および糖鎖の修飾は、DNAあるいはタンパク質の生合成の場合とは異なり、鋳型によらないpost-translational modification (翻訳後修飾) である。この翻訳後修飾

は小胞体およびゴルジ装置と呼ばれる細胞内小器官に局在する数多くの糖鎖生成関連酵素が介在する複雑な機構を通して行われる。すなわち、特定の単糖と、その結合様式に特異的な酵素 (糖加水分解酵素および糖転移酵素) の連携による複雑な生合成経路に従って、単糖が順次切り取られたり付加されたりしながら、所定の糖鎖構造が得られるように糖鎖が伸長されていく。

【0008】このような糖加水分解酵素や糖転移酵素は、小胞体やゴルジ装置の内膜上に埋め込まれた状態で存在し、糖鎖の生合成経路に従って、種類別に小胞体やゴルジ装置内膜の特定の場所に配置されている (Kornfeld, R. and Kornfeld, S., *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664 (1985)、辻崇一, *細胞工学* 15, 726-734 (1996))。

【0009】ゴルジ装置は膜で囲まれた扁平な嚢が積み重なった層状の構造を取っており、シスゴルジ、メディアルゴルジ、トランスゴルジと呼ばれる区画に分かれている。タンパク質分子が小胞体からシスゴルジ、メディアルゴルジ、トランスゴルジへと順次輸送されていく間に、これらの細胞内小器官内膜に存在する各酵素の作用を順番に受けることによって、付加されている糖鎖の構造は修飾を受ける。この際、各酵素の作用の状態によっては、その酵素の付加すべき単糖が付加されたりされなかったりすることがある。このため、糖タンパク質に付加される糖鎖は、1種のタンパク質においてもタンパク質の分子ごとに微妙に異なるのが通常である。

【0010】このようにタンパク質分子ごとに多様性を示す糖鎖の構造を制御することは、例えば、個々のタンパク質分子に付加した糖鎖の型を均一化することにより、組み換えタンパク質としての均一性を向上させることにつながる。また、糖鎖の分岐構造を増加させることにより、血中クリアランス時間の延長が期待できる。したがって、糖鎖構造制御技術に産業上高い有用性があるのは明らかである。しかしながら、糖鎖構造を自由に制御できる技術は未だ確立されていない。

【0011】ところで、糖鎖構造を制御するために最も基本的なことは、糖鎖の骨格となる分岐構造を制御することである。中でも、とりわけ重要と考えられるのはN-結合型複合型糖鎖の分岐構造を制御する技術である。N-結合型複合型糖鎖においては、その分岐構造は β -1, 4-N-アセチルグルコサミン転移酵素IV (省略の場合はGnT-IVと表記する) 及び β -1, 6-N-アセチルグルコサミン転移酵素V (省略の場合はGnT-Vと表記する) の作用によって形成される (図1)。これらの酵素は糖鎖生成の中間段階で作用し、糖鎖の骨格となる分岐構造を決定する。これらの酵素のゴルジ装置内における存在部位は明確には実証されていないが、GnT-IVはメディアルゴルジに局在するといわれている (飯田静夫, 糖鎖 I. 糖鎖と生命 (永井克孝編) 東京化学同人, p. 12-14, Roth, J. and Berger, E. G., *J. Cell. Biol.* vol. 92, 223-229 (1982), Goldberg,

D. E. and Kornfeld, S., J. Biol. Chem. vol. 258, 3159-3165 (1983))。なお、GnT-Vの局在に関する知見はない。なお、これらの酵素が作用した後、トランスゴルジに存在するガラクトース転移酵素 (Nilsson et al., J. Cell Biol., Vol. 120, 5-13 (1993))、トランスゴルジおよびトランスゴルジネットワークに存在するシアル酸転移酵素、などが作用して、分岐鎖の先にガラクトースやシアル酸などが付加され、糖鎖構造が完成に到る。すなわち、糖鎖の構造は、生合成の中間段階で、骨格となる分岐構造が種々のN-アセチルグルコサミン転移酵素によって形成された後、分岐鎖末端の構造がいくつかの糖転移酵素の作用を受けて修飾され、最終的な糖鎖構造に至るのである。

【0012】糖鎖構造を改変する方法としては、糖タンパクを産生させる細胞に外来糖転移酵素を付与する方法が検討されており、その一例として、糖転移酵素遺伝子を遺伝子工学的手法で細胞に導入し、特定酵素を過剰発現させる方法が挙げられる。このような方法は、近年、糖鎖生物学の分野において、各種糖転移酵素の遺伝子が次々とクローニングされたことによって可能となった。遺伝子がクローニングされた糖転移酵素としては、例えば、 β -1,4-ガラクトース転移酵素 (Neng-Wen Lo, Joel H. Shaper, Jonathan Pevsner and Nancy L. Shaper, Glycobiology vol. 8, 517-526 (1998))、GnT-V (Shoreibah et al., J. Biol. Chem. vol. 268, 15381-15385 (1993); 特表平6-510914, Saito et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 198, 318-327 (1994); 特開平6-197756)、GnT-IV (Minowa, M. T., Oguri, S., Yoshida, A., Hara, T., Iwamatsu, A., Ikenaga, H., Takeuchi, M., J. Biol. Chem. vol. 273, 11556-11562 (1998))などを挙げることができる。

【0013】糖転移酵素遺伝子を細胞に導入して細胞内の糖転移酵素活性を制御し、糖鎖構造を制御する方法としては、細胞内の β -1,4-ガラクトース転移酵素(省略の場合はGalTと表記する)遺伝子の発現量を制御し、該細胞内での β -1,4-N-アセチルグルコサミン転移酵素III (GnT-III) 活性に対するGalTの相対活性を調節することによって、バイセクト糖鎖の割合を制御する方法が知られている(特開平10-80276)。しかし、ここで開示されている技術は、糖鎖の構造をバイセクト構造に限って部分的に制御するものであり、糖タンパク質の糖鎖構造を自由に制御するには及ばない。GnT-IIIは、バイセクト構造と呼ばれる糖鎖構造を形成する酵素であり、糖鎖の分岐構造を形成するGnT-IVおよびGnT-Vとは全く異なる酵素である。

【0014】糖転移酵素の遺伝子を細胞に導入して糖鎖の分岐構造を制御した例としては、GnT-V遺伝子を細胞に導入強化し、細胞が産生するタンパク質の糖鎖分岐数を増加させる方法が、エリスロポエチンにおいて示

されている(特開平9-84582号公報)。しかしながら、GnT-V遺伝子を導入強化する手法では、糖鎖の分岐数を増加させることはできても、糖鎖の分岐数を所望とする範囲内に抑制することができないため、糖鎖の分岐構造を制御する技術としては不十分である。

【0015】このように、部分的に糖鎖構造を改変することは現在可能となっているが、糖鎖構造を自由に制御するには到っていない。

【0016】一方、糖鎖の分岐構造の形成を担う酵素であるGnT-IVとGnT-Vの基礎的な知見としては、タンパク質から遊離させた糖鎖を基質とした実験におけるinvitroでの反応特異性が知られている(Gleeson, P. and Schachter, H., J. Biol. Chem. vol. 258, 6162-6173 (1983), Cummings, R. D., Trowbridge, I. S. and Kornfeld, S., J. Biol. Chem. vol. 257, 13421-13427 (1982))。しかしながら、これらの酵素が実際に細胞内で作用する場合に、in vitroで観察された現象が再現されるかどうかは全く不明である。これは、糖転移酵素がタンパク質に作用する場合に、糖タンパク質の立体構造が糖転移酵素の反応性に影響を及ぼすため、タンパク質に付加される糖鎖の実際の構造が、遊離糖鎖を用いての研究で明らかにされている糖転移酵素の性質から予測される糖鎖構造と必ずしも一致しないからである(藤井茂, 蛋白質核酸 酵素 vol. 37, 2066-2070 (1992))。

【0017】また、上記の特開平10-80276号公報にはGalTとGnT-IIIの競合を利用したバイセクト糖鎖の組成調節法が開示されているが、GnT-IVとGnT-Vは、GnT-IIIとは全く異なる酵素であることから、同様にGnT-IV及び/またはGnT-VとGalTを細胞内で競合させることができるかどうかについては全く未知のことであった。それどころか、上述のようにGnT-IVはメディアルゴルジに局在し、GalTはトランスゴルジに局在すると報告されているように、細胞内においてGnT-IVとGalTの局在箇所が異なっていることから、両酵素の作用が細胞内で競合することなどは起こり得ないと考えられた。

【0018】このように、N-結合型糖鎖の骨格としての分岐構造の形成に大きく関与するGnT-IVとGnT-Vの細胞内での実際の作用や、これを制御するために必要な情報は従来技術において全く提供されていないのが現状である。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、真核細胞が細胞内外に産生する糖タンパク質において、付加されるN-結合型糖鎖の骨格構造である分岐構造を制御し、糖鎖の組成中における分岐数が異なる糖鎖の含有割合、すなわち、糖鎖の分岐組成(分岐数が異なる糖鎖の本数の、全糖鎖本数に占める割合)が制御または改変された糖タンパク質を製造する方法を提供することにある。

【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく、糖転移酵素の細胞内発現の制御に関する研究を鋭意重ねた結果、糖鎖工学研究分野の常識では考えられなかった現象を発見した。すなわち、本発明者らは、真核細胞内のGnT-IV及び/またはGnT-Vの活性に対するGalTの活性の比率と、産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の分岐組成（分岐数が異なる糖鎖の、糖鎖全体に占める割合）に相関があることを見出し、これにより、N-結合型糖鎖の分岐組成を制御するための画期的手法である本発明の開発に成功した。

【0021】すなわち、本発明は、N-結合型糖鎖を持つ糖タンパク質を細胞内外に産生し得る真核細胞でのGnT-IV及び/またはGnT-Vの活性に対するGalTの相対活性を調節することによって、産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数が異なる糖鎖の含有割合を制御する方法を提供するものである。

【0022】さらに、本発明は、上記方法により、N-結合型糖鎖において分岐数が異なる糖鎖の含有割合が制御または改変された糖タンパク質を細胞または培養液から回収することによる、N-結合型糖鎖の組成中において分岐数が異なる糖鎖の含有割合が制御または改変された糖タンパク質の製造方法を提供するものである。更に、本発明は、上記の方法によって得られるN-結合型糖鎖の組成中における分岐数が異なる糖鎖の含有割合が制御または改変された糖タンパク質及びそれを有効成分として含有する医薬製剤を提供するものである。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明における、N-結合型糖鎖において分岐数が異なる糖鎖の含有割合を制御するとは、具体的には、糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖における分岐数が異なる糖鎖の、糖鎖全体に対して占める割合を制御することを言う。

【0024】本発明に係わるN-結合型糖鎖は糖タンパク質を構成するタンパク質部分のアミノ酸配列中のアスパラギン残基に結合している糖鎖であって、N-アセチル-D-グルコサミン、D-マンノース、D-ガラクトース、L-フコースおよびシアル酸等の単糖により構成される。本発明に係わる糖タンパク質とは、タンパク質のアミノ酸配列中に、N-結合型糖鎖が結合する可能性のあるアスパラギン残基を少なくとも一つ以上持ち、そのうち少なくとも一カ所に糖鎖が結合しているタンパク質を示す。そのようなものの例として、インターフェロン群、エリスロポエチン、免疫グロブリン(Ig)M及びG、t-PA、インターロイキン群、トロンプオエチン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)などの糖タンパク質であるホルモン等、およびそれらの改変体等を挙げることができる。例えば糖タンパク質としてのヒト

インターフェロン- γ の単量体はN-結合型糖鎖の結合部位を2箇所所有している。

【0025】本発明に用いることのできる糖タンパク質生産細胞としては、真核生物由来のものであり、糖タンパク質を生産することのできるものであれば特に制限はなく、動物、植物、真核微生物の細胞等が挙げられる。動物細胞では、付着性細胞、浮遊性細胞の何れも使用でき、糖タンパク質を細胞内に生産蓄積する動物細胞でもよく、糖タンパク質を細胞外に分泌生産する動物細胞でもよい。例えば、抗体産生B細胞、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)産生細胞、インターフェロン- γ 産生細胞、エリスロポエチン産生細胞及びhCG産生細胞等を挙げることができる。具体的には、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)、サルVer o細胞、マウスL細胞、BHK、 $\phi 2$ (NIH3T3)、マウスC127細胞、サルCOS細胞、Hela細胞、マウスミエローマ、ヒトB細胞、ヒト絨毛癌細胞、抗緑膿菌IgM抗体産生B細胞株MP-5045(本細胞株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14976として寄託されている)、ヒトインターフェロン- γ 産生CHO細胞株HIF-D(アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションにATCC CRL-8200として寄託されている)等が挙げられる。なお、糖タンパク質産生細胞としてヒト由来細胞以外の細胞を用いる場合は、チャイニーズハムスター卵巣細胞またはそれに由来する細胞は、ヒトに近い糖鎖を付加する細胞として好適である。

【0026】本発明の方法によれば、GnT-IV、GnT-V、Gal-Tの発現を任意に調節し、細胞内のGnT-IV及び/またはGnT-V活性に対するGal-Tの相対活性の調節により、所望の分岐数を有する糖鎖を作成することができる。例えば、真核細胞でのGal-Tの遺伝子の発現量を増加させ、GnT-IV及び/またはGnT-V活性に対するGal-Tの相対活性を増加させることによって、真核細胞により産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖における分岐数の多い糖鎖の含有割合を減少させることができる。

【0027】更に、真核細胞でのGal-T遺伝子の発現量を減少させ、GnT-IV及び/またはGnT-V活性に対するGal-Tの相対活性の相対活性を減少させることによって、該真核細胞により産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖における分岐数の多い糖鎖の含有割合を増加させることができる。

【0028】なお、この場合の分岐数が多い糖鎖を、インターフェロン- γ の場合で説明すると図9に示す3本鎖型または4本鎖型である。すなわち、この分岐数が多い糖鎖の含有割合の増減は、後述するGnT-IV分岐鎖付加率及びGnT-V分岐鎖付加率で評価でき、これらの付加率を好ましくは10%以上増減させる場合に相当する。

【0029】GalTは、2本鎖、3本鎖、4本鎖などの構造の糖鎖にガラクトースを転移する糖転移酵素である(図2)。GalTの細胞内活性調節には、例えば、一般の遺伝子組み換えの手法を用いて、GalT遺伝子の発現を制御する方法を用いることができる。GalT遺伝子の発現増加法としては、一般の遺伝子組み換え技術を用いてGalT遺伝子を細胞に導入してその高発現を起こす方法や、相同組換え技術を用いて細胞固有のGalT遺伝子の発現制御部、例えばプロモーター部位を従来より高機能のものと入れ換える方法、などが挙げられる。GalTの発現抑制法としてはジエンターゲッティング法、アンチセンス法などが挙げられる。

【0030】遺伝子組み換え技術を用いてGalT遺伝子を細胞に導入し、それを高発現させる方法には一般的に知られている遺伝子導入技術を適用できる。この場合のGalT遺伝子としては、哺乳動物、例えばヒト由来のものを用いることができる。GalT遺伝子を細胞に導入して発現させるためのベクターとしては、細胞で目的遺伝子を発現することができるものならいかなるものでも利用でき、具体的には、動物ウイルスを利用したものとして、SV40、BPV(ウシパピローマウイルス)、アデノウイルス、レトロウイルス系が挙げられる。動物ウイルスは一般に、宿主細胞で働くプロモーター、RNAスプライシングシグナルとポリA付加シグナル、さらにプロモーターの活性を増大させるエンハンサーなど遺伝子発現に必要なシグナルに加えて、自己複製能もあるので、このような動物ウイルスを利用したベクターを用いることにより遺伝子を細胞内で増殖させてその発現量を増加させることができる。また、ネオマイシン耐性遺伝子や、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の選択マーカーの機能を有し、これにより形質転換細胞の選択手段を与え、目的とする形質転換細胞の単離を容易にすることが好ましい。

【0031】遺伝子を発現させるための制御部位である、プロモーターやエンハンサーとしては、動物細胞内で機能するもので、目的とする効果が得られるものを使用することができ、例えば、LTR(レトロウイルスのlong terminal repeat)、SV40、CMV(サイトメガロウイルス)、MT(メタロチオネイン)、アクチンなどのプロモーターや、LTR、SV40、CMVなどのエンハンサー配列が挙げられる。

【0032】本発明において使用し得る動物細胞用発現ベクターとしては、具体的には、ニワトリβ-アクチン遺伝子プロモーターの一部の塩基配列をウサギβ-グロビン由来の遺伝子に置き換えることにより外来遺伝子の高発現を可能とした構造を有するベクターであるpCXN系の発現ベクター、その中でも特にpCXN2(Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene vol. 108, p. 193-200, 1991, 特開平03-168087)が挙げられるが、その他、動物細胞用発現ベクターであれば特に限定され

ない。

【0033】作製した発現ベクターの細胞への導入法としては、最も一般的なリン酸カルシウム法のほか、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、プロトプラスト融合法、リボソーム融合法、赤血球ゴースト融合法、等を用いることができる。

【0034】GalT遺伝子の発現抑制法としてのジエンターゲッティング法では、一般の遺伝子組換え手法に従って以下の操作を行うことにより、GalT遺伝子の破壊を行うことが出来る。すなわち、宿主である細胞のGalT遺伝子のエキソン部分に、細胞の持つ相同組換えの性質を利用して、GalT遺伝子の機能を破壊する外来遺伝子を、細胞の有する正常なGalT遺伝子中に組換えて、あるいはGalT遺伝子の全部と入れ換えてやることにより、GalT発現機能の停止もしくは抑制された細胞株を得ることができる。

【0035】この方法は例えば以下のようにして行うことができる。まず、宿主である細胞のGalTエクソン及びその前後のイントロンを含む部分をクローニングして、前後をイントロンにはさまれたGalTエクソンのDNA断片を単離する。具体的には、市販の人染色体遺伝子ファージライブラリーから、適当なプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション法を用いることにより、目的のGalTエクソンを含むファージクローンを識別し、目的のGalTエクソンのDNA断片を単離することが出来る。用いるプローブは、GalTの構造遺伝子をコードする既知の配列の一部である合成DNAを用いてもよいし、さらにこれをプライマーとしてPCR法で作製した遺伝子断片を用いてもよい。

【0036】次に、こうして単離したDNA中にGalT蛋白質の機能を破壊できる外来DNAを挿入する。このエクソン中に挿入する外来DNAとしては、その挿入DNAが結果として翻訳後にGalT蛋白質の機能を破壊させるものなら特に限定はないが、挿入DNA部分に停止コドンを含んだり、コドンの読みとり枠を変えたりするものが好ましく、同時に、ネオマイシンや、ハイグロマイシン等の選択マーカーの機能を有し、これにより形質転換細胞の選択手段を与え、目的とする形質転換細胞の単離を容易にするものが特に好ましい。また、GalTエクソンの中に挿入されることによりGalT発現機能を奪うことのできるDNA断片の更に外側の両方又はその一方に、ウイルス由来のチミジンキナーゼの遺伝子を連結することにより、ガンシクロビルによる選択圧をかけることができ、スクリーニングを更に効率的に行うことが可能になる。このようにして構築された遺伝子断片を細胞に導入して、ネオマイシンやガンシクロビル等により選択圧をかけることにより、成育してきた形質転換細胞株の中から、染色体上の細胞がもともと所有していたGalT遺伝子が相同組換えによりGalT発現機能を持たない外来遺伝子に置き換わり、その結果GalT

Tの発現が停止した細胞を選択できる。この相同組換えによる置換え用として用いるDNA断片を細胞に導入する具体的方法としては、磷酸カルシウム等による従来の方法に加えて、リボソーム様の遺伝子導入の試薬を使う方法、また電気的パルスを加える方法（エレクトロポレーション）、遺伝子銃を用いて物理的に導入する方法等を用いることができる。一方、GalT遺伝子の発現抑制法としてのアンチセンス法では、GalT遺伝子のmRNA配列（センス鎖）に対して相補的な配列を有する遺伝子領域（アンチセンス鎖）を細胞の内外より供給することで、GalT遺伝子の発現を特異的に抑制することができる。アンチセンス鎖の供給法としては、任意の長さの逆向き配列（アンチセンス配列）をベクターに組み込み細胞内でRNAとして内在的に発現させる「アンチセンスRNA法」、および15～30塩基長の合成DNAを細胞培養液中に直接添加する「アンチセンスDNA法」等が利用できる。

【0037】GnT-IV遺伝子及びGnT-V遺伝子については既に知られており、これらの少なくとも1種の発現調節についても上述のGal-Tのそれに準じて行うことができる。

【0038】細胞内のGnT-IV及び/またはGnT-V活性に対するGalTの相対活性が目的とする値を持つ細胞株の選抜は、細胞内におけるこれらの糖転移酵素の活性を指標として行うことができる。糖転移酵素GnT-IV及びGnT-Vの活性測定は、西河らの方法（Nishikawa et al. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1035, 313-318, (1990)）を応用して行うことができる。すなわち、2-アミノピリジンにより還元末端を蛍光ラベルしたアガラクトシルパイアンテナ糖鎖（図3）を受容体糖鎖とし、これをUDP-N-アセチルグルコサミン（UDP-GlcNAc）を加えた緩衝液中にて細胞抽出液と反応させた後、反応生成物または残存する受容体糖鎖を高速液体クロマトグラフィーにより同定・定量することにより行うことができる。

【0039】糖転移酵素GalTの活性測定は長谷らの方法（Morita, N. et al., J. Biochem. vol. 103, 332-335 (1988)）を応用して行うことができる。すなわち、2-アミノピリジンにより還元末端を蛍光ラベルしたアガラクトシルパイアンテナ糖鎖（図3）を受容体糖鎖とし、これをUDP-ガラクトースを加えた緩衝液中にて細胞抽出液と反応させた後、反応生成物または残存する受容体糖鎖を高速液体クロマトグラフィーにより同定・定量することにより行うことができる。

【0040】本発明の方法により得られた細胞又は細胞株の培養は各種公知の方法を用いて行うことができ、細胞株の増殖および糖タンパク質の生産を阻害しないものであれば特に制限はない。例えばタンクでの浮遊培養、細胞をスチレン製のマイクロビーズ表面あるいはローラーボトル内壁等に附着させた接着培養、フラスコを用い

た静置培養等を細胞株に応じて適宜選択することができる。培養時間は、バッチ法で培養する場合には十分に細胞が増殖して糖タンパク質が十分に生産されるまで行えばよく、通常1週間～6カ月程度である。培養に際して培地の一部を無菌的に交換しながら連続的に培養を行なう場合は、培養時間は1週間～6カ月程度である。また培養に際しては、糖タンパク質を生産する細胞株を播種した後、適当な温度、通気状態、培地のpHを保ちながら該細胞株を培養する。

【0041】本発明の方法により得られた細胞株の培養に使用できる培地としては、基本培地に血清等の添加物を添加したものを用いることができる。基本培地としては市販されている細胞培養用の培地を用いることができ、例えばイーグル最少必須培地、RPMI-1640培地、ハムF12培地、ダルベッコ変法イーグル培地、CHO-S-SFMII培地（GIBCO BRL）、Opti-MEM培地（GIBCO BRL）等を、単独あるいは適宜混合して使用すればよい。また、細胞株の培養を、細胞数を増加させる増殖培養と、糖タンパク質を生産させる生産培養との二段階に区別して行い、異なる2種類の培地を用いることもできる。この場合、増殖培地として例えば上記基本培地に1～30%濃度のウシ胎児血清（FCS）を添加した栄養培地を用い、生産培地としてウシ胎児血清（FCS）を含まない上記基本培地を使用することにより、生産された糖タンパク質の精製工程における負荷を軽減することができる。

【0042】上述のようにして得られた培養物からの糖タンパク質の回収は通常の方法により可能である。細胞外に分泌生産される糖タンパク質は、適時培養液を交換する方法により培養液から、例えばイオン交換、生物学的親和性、吸着あるいは疎水性、親水性、分子サイズ、限外濾過等を利用した各種公知の精製方法で分離、精製することができる。

【0043】本発明の糖鎖分岐組成（N-結合型糖鎖）における、分岐数が異なる糖鎖の含有割合が制御または改変された糖タンパク質は医薬品として有効であり、これは一般的な医療製剤の形態で用いられる。そのような医薬品として、例えばヒトインターフェロン-γ、ヒトエリスロポエチン、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン等を含む製剤等が挙げられる。このような本発明の糖タンパク質を有効成分として含有する医薬製剤は、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、保湿剤、崩壊剤、界面活性剤、潤滑剤等の担体、希釈剤あるいは賦形剤を用いて調製される。本発明の医薬製剤としての各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、注射剤（液剤、懸濁剤）が挙げられる。本発明の医薬製剤には更に必要に応じて着色剤、保存剤、風味剤、甘味料や他の医薬品を含有することができる。医薬製剤に含有させる糖タンパク質の含有量は、糖タンパク

質の種類に応じて通常用いられている量とすることができ
る。

【0044】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を何等限定するものではない。

【参考例1】 ヒトインターフェロン- γ 産生CHO細胞H11F-D株によって生産したヒトインターフェロン- γ の糖鎖構造

糖タンパク質であるヒトインターフェロン- γ (以後、ヒトIFN- γ と省略)を産生するCHO細胞H11F-D株(ATTCより購入、ATCC NO. CRL-8200)を培養してヒトIFN- γ を生産し、その糖鎖構造を解析した。

(1) H11F-D株の培養

5×10⁵個のH11F-D細胞を75 Tフラスコ中の、10mlの培地[10%の透析済ウシ胎児血清(dFCS)、250nM MTX (methotrexate)を含む、CHO-S-SFMI培地(GIBCO BRL)]に播種し、CO₂インキュベーター中、37℃、5%CO₂条件下で静置培養した。3~4日後、confluentになったところで継代培養した。継代ごとに培養スケールを拡大して細胞を増殖させた。

【0045】増殖したH11F-D細胞4×10⁶個を175 Tフラスコ中の、35mlの上記培地に播種し、3日間培養後、トリプシン処理により細胞を遊離させて遠心回収し、全細胞を同培地200ml/500 Tトリプルフラスコで継代培養した。4日後、培地を除去し、PBS(-)30mlで洗浄した後、L-グルタミンを加えた無血清CD-CHO培地(GIBCO BRL)200mlに交換し、培地中にヒトIFN- γ を生産させた。24時間ごとに培地上清を回収し、その都度新鮮な培地に交換した。回収した培地はその都度遠心し、孔径0.22 μ mのフィルターでろ過後、集めて-20℃にて凍結保存した。

(2) ヒトIFN- γ の精製単離

上記により得たヒトIFN- γ 生産培地上清から、抗ヒトIFN- γ 抗体固定カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、ヒトIFN- γ を精製した。抗体固定カラムは、抗ヒトIFN- γ ポリクローナル抗体(ウサギ)(林原生物化学研究所)を担体HiTrap NHS-activated Sepharose HP(アマシヤムファルマシアバイオテック社製)に固定化して作製した。具体的な精製操作は次のとおりである。まず、培地上清を解凍後、孔径0.22 μ mのフィルターでろ過し、その500mlをカラムに通液してヒトIFN- γ を吸着させた後、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5M NaClで洗浄し、続いて洗浄液A(日本ガイシ製)で洗浄した。その後、0.2M グリシン-HClバッファー(pH 2.5)を通液してヒトIFN- γ を溶離させた。カラムからの溶出液の280nmにおける吸光度を測定し、タンパク質を検出した。

【0046】溶離したヒトIFN- γ 画分には、1M Tris-HCl (pH 8.0)を少量加えて中和した後、10mM Tris-HCl (pH 8.0)で透析後、凍結乾燥を行って精製ヒトIFN- γ 標品とした。得られたヒトIFN- γ の純度、分子量をSDS-PAGEによって確認した結果、不純タンパク質は含まれず、ヒトIFN- γ タンパク質としては、大部分が分子量24,000(糖鎖が2ヶ所に付加されたもの)のバンドとして検出された。なお、分子量20,000(糖鎖が1ヶ所に付加されたもの)のバンドも少量存在した他、分子量17,000(糖鎖の付加しないもの)のバンドがわずかに存在した。

(3) ヒトIFN- γ に付加される糖鎖の構造解析

①糖鎖の切り出し精製と蛍光標識

活性を保持したヒトIFN- γ は2量体として存在することが知られているが、1本のポリペプチド鎖上にはN-結合型糖鎖の結合部位が2ヶ所存在する。2ヶ所に付加された糖鎖を一括して切り出し、混合物として精製した。

a. 糖ペプチドの分離

凍結乾燥したヒトIFN- γ 0.5mgを6M Urea 200 μ lに溶解して60℃で1時間加熱した後、100mM Tris-HCl (pH 8.0)、1mM CaCl₂を1ml加え、Modified Trypsin (Promega社製)を酵素/ヒトIFN- γ (質量/質量)=1/50量添加し、37℃で一晩、酵素消化を行った。その後100℃で10分間加熱して反応を停止させ、孔径0.45 μ mのフィルターでろ過した後、Sephadex G-25(アマシヤムファルマシアバイオテック社製)によるゲルろ過を行い、糖ペプチド画分を回収した。バッファーには10mM NH₄HCO₃を用いた。糖ペプチドの検出にはオルシノール硫酸法を使用した。糖ペプチド画分は凍結乾燥して次操作に用いた。

b. 糖鎖の切り出しと精製

約10~100nmol量の糖ペプチドを100mM クエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.0)1mlに溶解し、アーモンド由来のグリコペプチダーゼA(生化学工業)0.4mUを加えて37℃で一晩反応させた。この反応液からの糖鎖の精製はSep-Pak C18カートリッジ(Waters製)を用いて行った。反応液を、Sep-Pak C18カートリッジに供し、糖鎖を0.1% TFA/5% アセトニトリル溶液で溶出させた。これを凍結乾燥して精製糖鎖標品とした。

c. 糖鎖の蛍光標識(ビリジリアミノ化)

約10~100nmolの糖鎖に対して40 μ lの2-アミノビリジン溶液(276mgの2-アミノビリジンを100 μ lの酢酸に溶かしたもの)を加え、90℃、60分間加熱した。次に、140 μ lのBorane-dimethylamine complex溶液(150mgのBorane-dimethylamine complexに酢酸60 μ lとH₂O 38 μ lを加えたもの)を加えて、80℃で35分間加熱した。次に、10mM NH₄HCO₃を緩衝液としてSephadex G-15(アマシヤムファルマシアバイオテック社製)によるゲルろ過を行い、ビリジリアミン標識糖鎖を精製した。精製

したピリジリアミン標識糖鎖（以下PA化糖鎖と呼ぶ）を以後の分析に使用した。

② PA化糖鎖の構造解析

PA化糖鎖をArthrobacter ureafaciens由来のシアリダーゼ（ナカライテスク社製）を用いて消化後、脱シアリ酸画分を陰イオン交換カラムMono Q HR5/5

（内径5mm×長さ50mm、アマシャムファルマシアバイオテック社製）を用いたHPLCで分取した。シアリ酸を除去した糖鎖（アシアロ糖鎖）は、逆相カラム（Shim-pack CLC-ODS、内径6mm×長さ150mm、島津製作所製）およびアミド吸着カラム（TSKgel Amide-80、内径4.6mm×長さ250mm、東ソー製）を用いたHPLCで分析を行った。HPLCで分離される各糖鎖の溶出時間を、PA化グルコースオリゴマー（重合度：3～22 または 3～15、宝酒造製）の溶出時間と比較して相対的グルコース重合度を求め、これをグルコース単位として表し、2次元糖鎖マップ（高橋禮子、糖蛋白質糖鎖研究法 生化学実験法23、学会出版センター、1989、及び高橋禮子、富谷昇、吉田友昭、糖タンパク質と糖結合タンパク質化学と生物 実験ライン20、廣川書店、1992）により構造推定及び定量を行った。また、それぞれの糖鎖構造を確認するため、HPLCで分離される各糖鎖を各種のグリコシダーゼ（ウシ腎臓由来の α -フコシダーゼ（Boehringer Mannheim社製）、ナタメ由来の β -ガラクトシダーゼ（生化学工業株式会社製）、 β -N-アセチルヘキシサミニダーゼ（生化学工業株式会社製）、Escherichia freundii由来エンド β -ガラクトシダーゼ（生化学工業株式会社製））を用いて消化し、消化前後の2

次元糖鎖マップ上における挙動を既知構造の糖鎖と比較した。試料糖鎖の推定構造と同一構造の標準PA化糖鎖が市販されているものについては、両者をHPLCで共打ちすることにより、単一ピークになることを確認した。

【0047】HIIF-D株の産生するヒトIFN- γ の糖鎖構造をHPLCによって同定・定量し、全糖鎖に占める各糖鎖構造の含有割合（%）を求めた。その結果を表1に示す。HIIF-D株の産生するヒトIFN- γ の糖鎖構造は、大部分が二本鎖構造であった。

【0048】表1は、HIIF-D株および参考例2、参考例3で示すGnT-V高発現株（V26）、GnT-IV/GnT-V両酵素高発現株（V26/IV5）のそれぞれが生産するヒトIFN- γ に付加される糖鎖について、糖鎖構造の同定・定量を行い、各糖鎖構造の全糖鎖に占める含有割合を求めた結果を、糖鎖の骨格構造で分類してまとめたものである。各分類の中には、糖鎖骨格構造の先（非還元末端側）にガラクトースあるいはN-アセチルラクタミンの繰返し構造を持つもの、さらにその先にシアリ酸が付加されたものなどが含まれる。なお、表中のUK1、UK2、UK3は、単糖組成以外は不明であり、詳細な糖鎖構造は未同定であるが、2本鎖、3本鎖、4本鎖といった通常の構造には分類できなかったものである。また、表中の2本鎖型～4本鎖型の糖鎖骨格構造は図9に示すとおりである。

【0049】

【表1】

GnT-IVまたはGnT-V高発現CHO株の
IFN- γ 糖鎖構造(骨格構造)

(数値の単位は%)

細胞株	元株	GnT-V 高発現株	GnT-IV、V 高発現株
糖鎖骨格構造	HIIF-D	V26	V26/IV5
2本鎖型	63.8	15.0	7.9
3本鎖(GnT-IV分岐)型	2.7	1.0	9.7
3本鎖(GnT-V分岐)型	13.4	58.8	10.5
4本鎖型	1.0	9.2	58.4
その他の骨格構造			
UK1(GlcNAc4・Man3)	15.8	4.9	1.6
UK2(GlcNAc5・Man3)	3.3	8.8	2.4
UK3(GlcNAc6・Man3)	n.d.	2.3	9.5
合 計	100.0	100.0	100.0

[参考例2] GnT-V高発現ヒトIFN- γ 産生CHO株によって生産したヒトIFN- γ の糖鎖構造

(1) GnT-V発現ベクターpCXH1-hGnTVの作製

一般的なDNA操作法は文献(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press., (1989))に従って行った。GnT-V遺伝子(ヒト由来)は配列表の配列番号: 1に示す配列を使用した。ベクターにはpCXN2(Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene, 108, p.193-200, 1991)から作製したpCXH1(図4)を使用した。GnT-V発現ベクターpCXH1-hGnT-Vは、図5に示す方法で作製した。

(2) GnT-V高発現株の取得

① HIIF-D株へのGnT-V発現ベクター; pCXH1-hGnT-Vの導入

Opti-MEM培地(GIBCO BRL) 0.4 mlに4×10⁶個のHIIF-D細胞を懸濁し、エレクトロポレーション法を用いてGnT-V発現ベクター; pCXH1-hGnT-Vを導入した。10分静置後、処理した細胞を10mlの10% dFCS、250nM MTX、CHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地に加えた後、適当な希釈率でシャーレに播種し、CO₂インキュベーター中、37℃、5% CO₂条件下で静置培養した。2日後、ハイグロマイシンを200 μ g/mlとなるように添加し、培養を継続した。約2週間後、出現してきたハイグロマイシン耐性コロニーを、クローニングリングを用いてトリ

プシン処理して遊離させ、クローン細胞として回収し、拡大培養した。

【0050】② N-アセチルグルコサミン転移酵素IV(GnT-IV)およびN-アセチルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)の活性測定

5.0×10⁵個の細胞をサンプルチューブに遠心回収し、PBS(-)で2回洗浄した。5 μ lの細胞懸濁保存液(1% Triton X-100を含む酵素反応緩衝液)に懸濁し-80℃にて保存した。これを、氷上で融解後、パス型超音波破碎装置(Bioruptor UC100-D2, OLYMPUS)により、氷水中破碎した。細胞破碎液を酵素源とし、UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)を基質、PA化アガラクトシルパイアンテナ型糖鎖を受容体糖鎖として、目的の酵素に応じた組成の反応液中でそれぞれ酵素反応を行い、未反応受容体糖鎖の残存率の経時的推移から酵素活性を評価した。すなわち、5 μ lの細胞破碎液の入ったサンプルチューブ中に、あらかじめ37℃に加温した20 μ l量の活性測定用反応液を添加することにより反応を開始し、37℃条件下、酵素反応を行った。反応液中より経時的に5 μ lを抜き出して50 μ lの反応停止液(10mM HEPES, 50mM EDTA, pH7.2)中に加え、3分間の煮沸により反応を停止させた。この一部をShim-pack CLC-ODS(内径6mm×長さ150mm、島津製作所製)を用いてHPLC分析し、経時的な受容体糖鎖の残存率を定量した。GnT-IVとGnT-Vの両方が存在する場合は、受容体糖鎖の残存率からは、それぞれの酵素の活性を区別できないので、GnT-IVはMn²⁺要求性、G

nT-VはMn²⁺非要求性であることから、EDTAを添加してMn²⁺をトラップした反応系でまずGnT-Vの活性だけを測定し、次にEDTA非存在下、Mn²⁺を添加した反応系で(GnT-IV+GnT-V)の活性合計を測定し、両者の差をGnT-IV活性とした。

【0051】GnT-V活性測定用反応液25μl中の組成は、10mM HEPES (pH7.2)、80mM UDP-GlcNAc、10mM EDTA、33mM NaCl、3mM KCl、200mM N-acetyl-D-glucosamine、0.2% Triton X-100、2.5μM PA化アガラクトシルパイアンテナ型糖鎖であり、(GnT-IV+GnT-V)活性測定用反応液25μl中の組成は、10mM HEPES (pH7.2)、80mM UDP-GlcNAc、10mM MnCl₂、33mM NaCl、3mM KCl、200mM N-acetyl-D-glucosamine、0.2% Triton X-100、2.5μM PA化アガラクトシルパイアンテナ型糖鎖である。

【0052】③ GnT-V高発現株のスクリーニング
上記①でクローニングした細胞を10% dFCS、250nM MTX、200μg/ml ハイグロマイシンを含むCHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地で継代培養して150Tフラスコスケールまで拡大培養した後、各細胞をトリプシン処理によって遊離させ、トリパンブルー染色にて生細胞数を計測後、上記②の方法に従い細胞内のGnT-IVおよびGnT-Vの活性測定を行った。また、各細胞株の培地上清中に産生されるヒトIFN-γ量をELISA法によって測定した。GnT-V活性の高い株をスクリーニングした結果、細胞内のGnT-V活性が元株H11F-Dに比較して約150倍に増加した株(V26株)を得た。

(3) ヒトIFN-γの生産培養
得られた細胞株(V26株)を用い、細胞を増殖させるための培地にハイグロマイシン200μg/mlを含むことを除き、参考例1と同様の方法で培養を行い、培地中にヒトIFN-γを生産させた。

(4) ヒトIFN-γの精製単離
得られた培地上清500mlを用い、参考例1と同様の方法でヒトIFN-γ 0.5mgを精製単離した。得られたヒトIFN-γの純度、分子量をSDS-PAGEによって確認した結果、不純タンパク質は含まれず、ヒトIFN-γタンパク質としては、大部分が分子量 24,000 (糖鎖が2ヶ所に付加されたもの) のバンドとして検出された。なお、分子量20,000 (糖鎖が1ヶ所に付加されたもの) のバンドも少量存在した他、分子量 17,000 (糖鎖の付加しないもの) のバンドがわずかに存在した。

(5) ヒトIFN-γに付加される糖鎖の構造解析
得られたヒトIFN-γについて、参考例1と同様の方法で糖鎖構造の同定・定量を行った。糖鎖構造の解析結果を表1に示す。参考例1に示したように元株H11F-Dの産生するヒトIFN-γの糖鎖は2本鎖型糖鎖が主要な構造であったのに対し、GnT-V遺伝子を導入したV26株では、産生されるヒトIFN-γの糖鎖構

造は主として3本鎖(GnT-V分岐)型糖鎖に変換された。

【参考例3】 GnT-IV、GnT-V両酵素の高発現ヒトIFN-γ産生CHO株によって生産したヒトIFN-γの糖鎖構造

(1) GnT-IV、GnT-V両酵素高発現株の取得
参考例2で得た細胞株(V26株)に、更にGnT-IV発現ベクターを参考例2と同様、エレクトロポレーション法で導入した。GnT-IV遺伝子(ウシ由来)は配列表の配列番号:2に示す配列を使用した。ベクターにはpCXN2(Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene, 108, p.193-200, 1991)を使用した。GnT-IV発現ベクター; pCXN2-bGnT-IVは図6に示す方法で作製した。

【0053】エレクトロポレーションによって遺伝子導入した細胞を、10分静置後、10mlの10% dFCS、250nM MTX、200μg/ml ハイグロマイシン、CHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地に加えた後、適当な希釈率でシャーレに播種し、CO₂インキュベーター中、37℃、5% CO₂条件下で静置培養した。2日後、ネオマイシン類縁体G418を300μg/mlとなるように添加し、培養を継続した。約2週間後、出現してきたハイグロマイシン、G418両薬剤耐性コロニーを、クローニングリングを用いてトリプシン処理して遊離させ、クローン細胞として回収し、拡大培養した。

【0054】クローニングした細胞を10% dFCS、250nM MTX、200μg/ml ハイグロマイシン、G418 300μg/mlを含むCHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地で継代培養して150Tフラスコスケールまで拡大培養し、参考例2と同様にGnT-IV、GnT-Vの活性測定を行った。また、各細胞株の培地上清中に産生されるヒトIFN-γ量をELISA法によって測定した。GnT-IV導入前のV26株に比べてGnT-IV活性が高い株をスクリーニングし、V26/IV5株を取得した。V26/IV5株は、元株H11F-Dに比べて、GnT-IV活性が約70倍、GnT-V活性が約120倍に増加していた。

(2) ヒトIFN-γの生産培養
得られた細胞株(V26/IV5株)を用い、細胞を増殖させるための培地にハイグロマイシン200μg/ml、G418 300μg/mlを含有することを除き、参考例1と同様の方法で培養を行い、培地中にヒトIFN-γを生産させた。

(3) ヒトIFN-γの精製単離
得られた培地上清 500mlを用い、参考例1と同様の方法でヒトIFN-γ 0.5mgを精製単離した。得られたヒトIFN-γの純度、分子量をSDS-PAGEによって確認した結果、不純タンパク質は含まれず、ヒトIFN-γタンパク質としては、大部分が分子量 24,000 (糖鎖が2ヶ所に付加されたもの) のバンドとして検出

された。なお、分子量20,000（糖鎖が1ヶ所に付加されたもの）のバンドも少量存在した他、分子量 17,000（糖鎖の付加しないもの）のバンドがわずかに存在した。

(4) ヒトIFN- γ に付加される糖鎖の構造解析
得られたヒトIFN- γ について、参考例1と同様の方法で糖鎖構造の同定・定量を行った。糖鎖構造の解析結果を表1に示す。GnT-IVとGnT-Vの両方が高発現した結果、産生されたヒトIFN- γ の糖鎖は主として4本鎖型糖鎖に変換された。

【0055】【実施例1】 GnT-V高発現株（V26株）にGalTを導入強化した細胞株によって生産したヒトIFN- γ の糖鎖構造

(1) GalT強化株の取得

参考例2で得た細胞株（V26株）に、更にGalT発現ベクターを参考例2と同様、エレクトロポレーション法で導入した。GalT遺伝子（ヒト由来）は配列表の配列番号3に示す配列を使用した。ベクターには pC XN2 (Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene, 108, p.193-200, 1991) を使用した。GalT発現ベクター pC XN2-GalTは図7に示す方法で作製した。

【0056】遺伝子導入した細胞を、参考例3と同様の方法で選抜培養し、ハイグロマイシン、ネオマイシン類縁体G418の両薬剤に耐性のクローンを分離した。クローニングした細胞は、10% d FCS、250nM MTX、200 μ g/ml ハイグロマイシン、G418 300 μ g/mlを含むCHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地で継代培養して150Tプラスコスケールまで拡大培養し、参考例2と同様にGnT-IV、GnT-Vの活性測定を行った。また、GalTの活性測定は、基質としてUDP-ガラクトース (Gal) を用いることを除き、参考例2に示したGnT-IV、GnT-Vの活性測定法と同様に行った。GalT反応液25 μ l中の組成は、10mM HEPES (pH7.2)、80mM UDP-Gal、10mM MnCl₂、33mM NaCl、3mM KCl、5.6mM γ -ガラクトノラクトン、0.2% Triton X-100、2.5 μ M PA化アガラクトシルバイアンテナ型糖鎖である。また、各細胞株の培地上清中に産生されるヒトIFN- γ 量をELISA法によって測定した。GalT活性が高い株をスクリーニングした結果、GalT強化前の株（V26株）に比べて、GalTを強く発現する株、V26/G1株を取得した。また、これらの細胞株におけるGnT-IVおよびGnT-V活性は、V26株とほとんど変わらなかった。

(2) ヒトIFN- γ の生産培養

得られた細胞株（V26/G1株）を用い、細胞を増殖させるための培地にハイグロマイシン（200 μ g/ml）、ネオマイシン類縁体G418（300 μ g/ml）を含有することを除き、参考例1と同様の方法で培養を行い、培地中にヒトIFN- γ を生産させた。

(3) ヒトIFN- γ の精製単離

V26/G1株の培養培地上清500 mlを用い、参考例1と同様の方法でヒトIFN- γ 0.5 mgを精製単離した。得られたヒトIFN- γ の純度、分子量をSDS-PAGEによって確認した結果、不純タンパク質は含まれず、ヒトIFN- γ タンパク質としては、大部分が分子量 24,000（糖鎖が2ヶ所に付加されたもの）のバンドとして検出された。なお、分子量20,000（糖鎖が1ヶ所に付加されたもの）のバンドも少量存在した他、分子量 17,000（糖鎖の付加しないもの）のバンドがわずかに存在した。

(4) ヒトIFN- γ に付加される糖鎖の構造解析

V26/G1株から得られたヒトIFN- γ について、参考例1と同様の方法で、糖鎖構造の同定・定量を行った。糖鎖構造の解析結果を表2に示す。GalT強化前のV26株のヒトIFN- γ で主要な3本鎖（GnT-V分岐）型糖鎖は、V26/G1株では減少した。一方、2本鎖型糖鎖が増加した。表中のGnT-V分岐鎖付加率は、複合型糖鎖全体（表2の（1）、（2）、（3）、（4）の合計）に占めるGnT-V分岐鎖（GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man）を持つ糖鎖（表2の（3）、（4）の合計）の比率を示す。V26/G1株では、GnT-V分岐鎖付加率が減少しており、GnT-Vによって付加される分岐鎖（GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man）の形成が抑制されていた。

【0057】

【表2】

GnT-V 高発現CHO株(V26)にGalTを導入強化した株の
IFN- γ 糖鎖構造(骨格構造)

(数値の単位は%)

		細胞株	
		GalT強化前	GalT強化株
		V26	V/G1
GalT活性(相対値)		1.0	30.9
GalT/GnT-V活性相対値		0.8	31.9
糖 鎖 骨 格 造	2本鎖型 (1)	15.0	30.6
	3本鎖(GnT-IV分岐)型 (2)	1.0	n.d.
	3本鎖(GnT-V分岐)型 (3)	58.8	49.1
	4本鎖型 (4)	9.2	3.4
	その他の骨格構造		
	ハイブリッド型	n.d.	16.9
	UK1(GlcNAc4・Man3)	4.9	n.d.
	UK2(GlcNAc5・Man3)	8.9	n.d.
	UK3(GlcNAc6・Man3)	2.2	n.d.
合 計		100.0	100.0
GnT-V分岐鎖付加率(%)		80.9	63.1

【実施例2】5% GnT-IV、GnT-V両酵素高発現株(V26/IV5株)にGalTを導入強化した細胞株によって生産したヒトIFN- γ の糖鎖構造

(1) GalT強化株の取得

参考例3で得た細胞株(V26/IV5株)に、更にGalT発現ベクターを参考例2と同様、エレクトロポレーション法で導入した。

【0058】ただし、GalT発現ベクターと同時に、ピューロマイシン耐性遺伝子発現ベクターpPUR(Clontech社製)も導入した(コトランスフェクション)。

【0059】GalT遺伝子(ヒト由来)は配列表の配列番号3に示す配列を使用した。ベクターにはpCXN2(Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Gene, 108, p.193-200, 1991)を使用した。GalT発現ベクターpCXN2-GalTは図7に示す方法で作製した。

【0060】エレクトロポレーションによって遺伝子導入した細胞を、10分静置後、10 mlの10% dFCS、250nM MTX、200 μ g/ml ハイグロマイシン、300 μ g/ml G418(ネオマイシン類縁体)、CHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地に加えた後、適当な希釈

率でシャーレに播種し、CO₂インキュベーター中、37℃、5% CO₂条件下で静置培養した。2日後、ピューロマイシンを5 μ g/mlとなるように添加し、培養を継続した。約2週間後、出現してきたハイグロマイシン、G418、ピューロマイシンの3薬剤に耐性のコロニーを、クローニングリングを用いてトリプシン処理して遊離させ、クローン細胞として回収し、拡大培養した。クローニングした細胞は、10% dFCS、250nM MTX、200 μ g/ml ハイグロマイシン、G418 300 μ g/ml、ピューロマイシン 5 μ g/mlを含むCHO-S-SFMII(GIBCO BRL)培地で継代培養して150Tプラスコスケールまで拡大培養し、実施例1と同様にGnT-IV、GnT-V、GalTの活性測定を行った。また、各細胞株の培地上清中に産生されるヒトIFN- γ 量をELISA法によって測定した。GalT活性の高い株をスクリーニングした結果、GalT強化前の株(V26/IV5株)に比べてGalTを強く発現する株、V/IV/G1、V/IV/G2、V/IV/G3、V/IV/G4の4株を取得した。また、これらの細胞株におけるGnT-IVおよびGnT-V活性は、V26/IV5株とほとんど変わらなかった。

(2) ヒトIFN- γ の生産培養

得られた細胞株、V/IV/G1、V/IV/G2、V/IV/G3、V/IV/G4の4株を用い、細胞を増殖させるための培地にハイグロマイシン200 μ g/ml、G418 300 μ g/ml、ピューロマイシン5 μ g/mlを含有することを除き、参考例1と同様の方法でそれぞれ培養を行い、培地中にヒトIFN- γ を生産させた。

(3) ヒトIFN- γ の精製単離

得られた培地上清各500 mlを用い、参考例1と同様の方法で、それぞれ培地中よりヒトIFN- γ 0.5 mgを精製単離した。得られたヒトIFN- γ の純度、分子量をSDS-PAGEによって確認した結果、不純タンパク質は含まれず、ヒトIFN- γ タンパク質としては、大部分が分子量 24,000(糖鎖が2ヶ所に付加されたもの)のバンドとして検出された。なお、分子量20,000(糖鎖が1ヶ所に付加されたもの)のバンドも少量存在した他、分子量 17,000(糖鎖の付加しないもの)のバンドがわずかに存在した。

(4) ヒトIFN- γ に付加される糖鎖の構造同定

各GalT強化株から得られたヒトIFN- γ について、参考例1と同様の方法で、それぞれ糖鎖構造の同定・定量を行った。糖鎖構造の解析結果を表3に示す。GalT強化前のV26/IV5株のヒトIFN- γ で主要な構造であった4本鎖型糖鎖は、これらのGalT強化株では減少した。一方、2本鎖型糖鎖と3本鎖(GnT-V分岐)型糖鎖が増加した。表中のGnT-IV分岐鎖付加率は、複合型糖鎖全体(表3の(1)、(2)、(3)、(4)の合計)に占めるGnT-IV分岐鎖(GlcNAc β 1-4Man α 1-3Man)を持つ糖鎖

(表3の(2), (4)の合計)の比率を示す。GnT-V分岐鎖付加率は、複合型糖鎖全体(表3の(1), (2), (3), (4)の合計)に占めるGnT-V分岐鎖(GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man)を持つ糖鎖(表3の(3), (4)の合計)の比率を示す。GalT強化株では、GnT-V分岐鎖付加率およびGnT-IV分岐鎖付加率が減少しており、GnT-Vによって付加される分岐鎖(GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man)および、GnT-IVによって付加される分岐鎖(GlcNAc β 1-4Man α 1-3Man)の両方において分岐形成が抑制されていた。特に、

GnT-IV分岐鎖付加率の抑制が顕著であった。V26/IV5株および各GalT強化株における、GnT-IV活性に対するGalT活性の相対値と、ヒトIFN- γ の糖鎖におけるGnT-IV分岐鎖付加率の関係を図8に示す。細胞内のGnT-IV活性に対するGalTの相対活性が大きいくほど、GnT-IVによって付加される分岐鎖(GlcNAc β 1-4Man α 1-3Man)の形成が抑制されていた。

【0061】

【表3】

GnT-IV,V高発現CHO株(V26/IV5)にGalTを導入強化した株のIFN- γ 糖鎖構造(骨格構造)

(数値の単位は%)

		細胞株	GalT強化前	GalT強化株				
			V26/IV5	V/IV/G1	V/IV/G2	V/IV/G3	V/IV/G4	
GalT活性（相対値）			1.0	9.6	12.5	13.5	35.6	
GalT/GnT-IV活性相対値			0.9	8.0	8.8	8.9	17.8	
GalT/GnT-V活性相対値			0.8	9.5	18.3	13.5	27.8	
糖 鎖 骨 格 構 造	2本鎖型 (1)	7.9	21.1	23.6	21.8	21.5		
	3本鎖(GnT-IV分岐)型 (2)	9.7	12.4	10.5	10.0	7.4		
	3本鎖(GnT-V分岐)型 (3)	10.5	20.9	27.2	28.6	32.0		
	4本鎖型 (4)	58.4	36.7	28.1	21.1	10.3		
	その他の骨格構造							
	ハイブリッド型	nd.	8.0	9.7	15.7	24.4		
	高マンノース型(M6)	nd.	0.9	0.9	2.8	4.4		
	UK1(GlcNAc4・Man3)	1.6	nd.	nd.	nd.	nd.		
	UK2(GlcNAc5・Man3)	2.4	nd.	nd.	nd.	nd.		
	UK3(GlcNAc6・Man3)	9.5	nd.	nd.	nd.	nd.		
合 計		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
GnT-IV分岐鎖付加率（%）			78.7	53.8	43.2	38.2	24.8	
GnT-V分岐鎖付加率（%）			79.7	63.2	61.8	60.9	59.3	

nd.; <0.5%

【0062】

【発明の効果】本発明によれば、糖タンパク質を細胞内外に産生する細胞において、細胞内の β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の発現量を制御し、該細胞内のN-アセチルグルコサミン転移酵素IV及び/またはN-アセチルグルコサミン転移酵素Vの活性に対する β -1, 4-ガラクトース転移酵素遺伝子の相対活性を調節することによって、産生される糖タンパク質に付加されるN-結合型糖鎖において、分岐数が異なる糖鎖の含

有割合を制御することが可能である。また該細胞を培養して、目的の糖タンパク質を細胞内または細胞外に生産させ、該細胞または培養液から目的の糖タンパク質を回収することによって、N-結合型糖鎖において分岐数が異なる糖鎖の含有割合が制御または改変された糖タンパク質を得ることができる。

【0063】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 2226

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の特徴：G n T-V遺伝子 (ヒト由来)

配列：

ATG GCT CTC TTC ACT CCG TGG AAG TTG TCC TCT CAG AAG CTG GGC TTT	48
Met Ala Leu Phe Thr Pro Trp Lys Leu Ser Ser Gln Lys Leu Gly Phe	
5 10 15	
TTC CTG GTG ACT TTT GGC TTC ATT TGG GGT ATG ATG CTT CTG CAC TTT	96
Phe Leu Val Thr Phe Gly Phe Ile Trp Gly Met Met Leu Leu His Phe	
20 25 30	
ACC ATC CAG CAG CGA ACT CAG CCT GAA AGC AGC TCC ATG CTG CGC GAG	144
Thr Ile Gln Gln Arg Thr Gln Pro Glu Ser Ser Ser Met Leu Arg Glu	
35 40 45	
CAG ATC CTG GAC CTC AGC AAA AGG TAC ATC AAG GCA CTG GCA GAA GAA	192
Gln Ile Leu Asp Leu Ser Lys Arg Tyr Ile Lys Ala Leu Ala Glu Glu	
50 55 60	
AAC AGG AAT GTG GTG GAT GGG CCA TAC GCT GGA GTC ATG ACA GCT TAT	240
Asn Arg Asn Val Val Asp Gly Pro Tyr Ala Gly Val Met Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
GAT CTG AAG AAA ACC CTT GCT GTG TTA TTA GAT AAC ATT TTG CAG CGC	288
Asp Leu Lys Lys Thr Leu Ala Val Leu Leu Asp Asn Ile Leu Gln Arg	
85 90 95	
ATT GGC AAG TTG GAG TCG AAG GTG GAC AAT CTT GTT GTC AAT GGC ACC	336
Ile Gly Lys Leu Glu Ser Lys Val Asp Asn Leu Val Val Asn Gly Thr	
100 105 110	
GGA ACA AAC TCA ACC AAC TCC ACT ACA GCT GTT CCC AGC TTG GTT GCA	384
Gly Thr Asn Ser Thr Asn Ser Thr Thr Ala Val Pro Ser Leu Val Ala	
115 120 125	
CTT GAG AAA ATT AAT GTG GCA GAT ATC ATT AAC GGA GCT CAA GAA AAA	432
Leu Glu Lys Ile Asn Val Ala Asp Ile Ile Asn Gly Ala Gln Glu Lys	
130 135 140	
TGT GTA TTG CCT CCT ATG GAC GGC TAC CCT CAC TGT GAG GGA AAG ATC	480
Cys Val Leu Pro Pro Met Asp Gly Tyr Pro His Cys Glu Gly Lys Ile	
145 150 155 160	
AAG TGG ATG AAA GAC ATG TGG CGT TCA GAT CCC TGC TAC GCA GAC TAT	528
Lys Trp Met Lys Asp Met Trp Arg Ser Asp Pro Cys Tyr Ala Asp Tyr	
165 170 175	
GGA GTG GAT GGA TCC ACC TGC TCT TTT TTT ATT TAC CTC AGT GAG GTT	576
Gly Val Asp Gly Ser Thr Cys Ser Phe Phe Ile Tyr Leu Ser Glu Val	
180 185 190	
GAA AAT TGG TGT CCT CAT TTA CCT TGG AGA GCA AAA AAT CCC TAC GAA	624
Glu Asn Trp Cys Pro His Leu Pro Trp Arg Ala Lys Asn Pro Tyr Glu	
195 200 205	
GAA GCT GAT CAT AAT TCA TTG GCG GAA ATT CGT ACA GAT TTT AAT ATT	672
Glu Ala Asp His Asn Ser Leu Ala Glu Ile Arg Thr Asp Phe Asn Ile	
210 215 220	
CTC TAC AGT ATG ATG AAA AAG CAT GAA GAA TTC CGG TGG ATG AGA CTA	720
Leu Tyr Ser Met Met Lys Lys His Glu Glu Phe Arg Trp Met Arg Leu	
225 230 235 240	
CGG ATC CGG CGA ATG GCT GAC GCA TGG ATC CAA GCA ATC AAG TCC CTG	768

Arg Ile Arg Arg Met Ala Asp Ala Trp Ile Gln Ala Ile Lys Ser Leu	
245 250 255	
GCA GAA AAG CAG AAC CTT GAA AAG AGA AAG CGG AAG AAA GTC CTC GTT	816
Ala Glu Lys Gln Asn Leu Glu Lys Arg Lys Arg Lys Lys Val Leu Val	
260 265 270	
CAC CTG GGA CTC CTG ACC AAG GAA TCT GGA TTT AAG ATT GCA GAG ACA	864
His Leu Gly Leu Leu Thr Lys Glu Ser Gly Phe Lys Ile Ala Glu Thr	
275 280 285	
GCT TTC AGT GGT GGC CCT CTT GGT GAA TTA GTT CAA TGG AGT GAT TTA	912
Ala Phe Ser Gly Gly Pro Leu Gly Glu Leu Val Gln Trp Ser Asp Leu	
290 295 300	
ATT ACA TCT CTG TAC TTA CTG GGC CAT GAC ATT AGG ATT TCA GCT TCA	960
Ile Thr Ser Leu Tyr Leu Leu Gly His Asp Ile Arg Ile Ser Ala Ser	
305 310 315 320	
CTG GCT GAG CTC AAG GAA ATC ATG AAG AAG GTT GTA GGA AAC CGA TCT	1008
Leu Ala Glu Leu Lys Glu Ile Met Lys Lys Val Val Gly Asn Arg Ser	
325 330 335	
GGC TGC CCA ACT GTA GGA GAC AGA ATT GTT GAG CTC ATT TAC ATT GAT	1056
Gly Cys Pro Thr Val Gly Asp Arg Ile Val Glu Leu Ile Tyr Ile Asp	
340 345 350	
ATT GTA GGA CTT GCT CAA TTC AAG AAA ACT CTT GGA CCA TCC TGG GTT	1104
Ile Val Gly Leu Ala Gln Phe Lys Lys Thr Leu Gly Pro Ser Trp Val	
355 360 365	
CAT TAC CAG TGC ATG CTC CGA GTC CTT GAT TCA TTT GGT ACT GAA CCC	1152
His Tyr Gln Cys Met Leu Arg Val Leu Asp Ser Phe Gly Thr Glu Pro	
370 375 380	
GAA TTT AAT CAT GCA AAT TAT GCC CAA TCG AAA GGC CAC AAG ACC CCT	1200
Glu Phe Asn His Ala Asn Tyr Ala Gln Ser Lys Gly His Lys Thr Pro	
385 390 395 400	
TGG GGA AAA TGG AAT CTG AAC CCT CAG CAG TTT TAT ACC ATG TTC CCT	1248
Trp Gly Lys Trp Asn Leu Asn Pro Gln Gln Phe Tyr Thr Met Phe Pro	
405 410 415	
CAT ACC CCA GAC AAC AGC TTT CTG GGG TTT GTG GTT GAG CAG CAC CTG	1296
His Thr Pro Asp Asn Ser Phe Leu Gly Phe Val Val Glu Gln His Leu	
420 425 430	
AAC TCC AGT GAT ATC CAC CAC ATT AAT GAA ATC AAA AGG CAG AAC CAG	1344
Asn Ser Ser Asp Ile His His Ile Asn Glu Ile Lys Arg Gln Asn Gln	
435 440 445	
TCC CTT GTG TAT GGC AAA GTG GAT AGC TTC TGG AAG AAT AAG AAG ATC	1392
Ser Leu Val Tyr Gly Lys Val Asp Ser Phe Trp Lys Asn Lys Lys Ile	
450 455 460	
TAC TTG GAC ATT ATT CAC ACA TAC ATG GAA GTG CAT GCA ACT GTT TAT	1440
Tyr Leu Asp Ile Ile His Thr Tyr Met Glu Val His Ala Thr Val Tyr	
465 470 475 480	
GGC TCC AGC ACA AAG AAT ATT CCC AGT TAC GTG AAA AAC CAT GGT ATC	1488
Gly Ser Ser Thr Lys Asn Ile Pro Ser Tyr Val Lys Asn His Gly Ile	
485 490 495	
CTC AGT GGA CGG GAC CTG CAG TTC CTT CTT CGA GAA ACC AAG TTG TTT	1536
Leu Ser Gly Arg Asp Leu Gln Phe Leu Leu Arg Glu Thr Lys Leu Phe	
500 505 510	

GTT GGA CTT GGG TTC CCT TAC GAG GGC CCA GCT CCC CTG GAA GCT ATC 1584
 Val Gly Leu Gly Phe Pro Tyr Glu Gly Pro Ala Pro Leu Glu Ala Ile
 515 520 525
 GCA AAT GGA TGT GCT TTT CTG AAT CCC AAG TTC AAC CCA CCC AAA AGC 1632
 Ala Asn Gly Cys Ala Phe Leu Asn Pro Lys Phe Asn Pro Pro Lys Ser
 530 535 540
 AGC AAA AAC ACA GAC TTT TTC ATT GGC AAG CCA ACT CTG AGA GAG CTG 1680
 Ser Lys Asn Thr Asp Phe Phe Ile Gly Lys Pro Thr Leu Arg Glu Leu
 545 550 555 560
 ACA TCC CAG CAT CCT TAC GCT GAA GTT TTC ATC GGG CGG CCA CAT GTG 1728
 Thr Ser Gln His Pro Tyr Ala Glu Val Phe Ile Gly Arg Pro His Val
 565 570 575
 TGG ACT GTT GAC CTC AAC AAT CAG GAG GAA GTA GAG GAT GCA GTG AAA 1776
 Trp Thr Val Asp Leu Asn Asn Gln Glu Glu Val Glu Asp Ala Val Lys
 580 585 590
 GCA ATT TTA AAT CAG AAG ATT GAG CCA TAC ATG CCA TAT GAA TTT ACG 1824
 Ala Ile Leu Asn Gln Lys Ile Glu Pro Tyr Met Pro Tyr Glu Phe Thr
 595 600 605
 TGC GAG GGG ATG CTA CAG AGA ATC AAT GCT TTC ATT GAA AAA CAG GAC 1872
 Cys Glu Gly Met Leu Gln Arg Ile Asn Ala Phe Ile Glu Lys Gln Asp
 610 615 620
 TTC TGC CAT GGG CAA GTG ATG TGG CCA CCC CTC AGC GCC CTA CAG GTC 1920
 Phe Cys His Gly Gln Val Met Trp Pro Pro Leu Ser Ala Leu Gln Val
 625 630 635 640
 AAG CTT GCT GAG CCC GGG CAG TCC TGC AAG CAG GTG TGC CAG GAG AGC 1968
 Lys Leu Ala Glu Pro Gly Gln Ser Cys Lys Gln Val Cys Gln Glu Ser
 645 650 655
 CAG CTC ATC TGC GAG CCT TCT TTC TTC CAG CAC CTC AAC AAG GAC AAG 2016
 Gln Leu Ile Cys Glu Pro Ser Phe Phe Gln His Leu Asn Lys Asp Lys
 660 665 670
 GAC ATG CTG AAG TAC AAG GTG ACC TGC CAA AGC TCA GAG CTG GCC AAG 2064
 Asp Met Leu Lys Tyr Lys Val Thr Cys Gln Ser Ser Glu Leu Ala Lys
 675 680 685
 GAC ATC CTG GTG CCC TCC TTT GAC CCT AAG AAT AAG CAC TGT GTG TTT 2112
 Asp Ile Leu Val Pro Ser Phe Asp Pro Lys Asn Lys His Cys Val Phe
 690 695 700
 CAA GGT GAC CTC CTG CTC TTC AGC TGT GCA GGC GCC CAC CCC AGG CAC 2160
 Gln Gly Asp Leu Leu Leu Phe Ser Cys Ala Gly Ala His Pro Arg His
 705 710 715 720
 CAGA GG GTC TGC CCC TGC CGG GAC TTC ATC AAG GGC CAG GTG GCT CTC 2208
 Gln Arg Val Cys Pro Cys Arg Asp Phe Ile Lys Gly Gln Val Ala Leu
 725 730 735
 TGC AAA GAC TGC CTA TAG 2226
 Cys Lys Asp Cys Leu ***
 740

配列番号：2

配列の長さ：1608

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の特徴：G n T-IV遺伝子（ウシ由来）

配列：

ATG AGG CTC CGA AAT GGA ACT GTA GCC ACT GTT TTA GCA TTT ATC ACC	48
Met Arg Leu Arg Asn Gly Thr Val Ala Thr Val Leu Ala Phe Ile Thr	
5 10 15	
TCG TTC CTC ACT TTA TCT TGG TAT ACA ACA TGG CAA AAT GGG AAA GAA	96
Ser Phe Leu Thr Leu Ser Trp Tyr Thr Thr Trp Gln Asn Gly Lys Glu	
20 25 30	
AAA GTG ATT GCT TAT CAA CGA GAA TTT CTT GCT CTG AAA GAA CGT CTC	144
Lys Val Ile Ala Tyr Gln Arg Glu Phe Leu Ala Leu Lys Glu Arg Leu	
35 40 45	
CGA ATA GCT GAA CAT CGA ATC TCT CAG CGC TCT TCT GAG CTC AGT GCC	192
Arg Ile Ala Glu His Arg Ile Ser Gln Arg Ser Ser Glu Leu Ser Ala	
50 55 60	
ATT GTA CAG CAA TTC AAG CGT GTA GAA GCA GAA ACA AAC AGG AGT AAG	240
Ile Val Gln Gln Phe Lys Arg Val Glu Ala Glu Thr Asn Arg Ser Lys	
65 70 75 80	
GAT CCA GTG AAT AAA TTT TCA GAT GAT ACC CTA AAG ATA CTA AAG GAG	288
Asp Pro Val Asn Lys Phe Ser Asp Asp Thr Leu Lys Ile Leu Lys Glu	
85 90 95	
TTA ACA AGC AAA AAG TCT CTT CAA GTG CCA AGT ATT TAT TAT CAT TTG	336
Leu Thr Ser Lys Lys Ser Leu Gln Val Pro Ser Ile Tyr Tyr His Leu	
100 105 110	
CCT CAT TTA TTG CAA AAT GAA GGA AGC CTT CAA CCT GCC GTG CAG ATC	384
Pro His Leu Leu Gln Asn Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ala Val Gln Ile	
115 120 125	
GGA AAT GGA CGA ACA GGA GTT TCA ATA GTA ATG GGA ATT CCT ACA GTG	432
Gly Asn Gly Arg Thr Gly Val Ser Ile Val Met Gly Ile Pro Thr Val	
130 135 140	
AAG AGA GAA GTT AAA TCT TAC CTC ATA GAA ACT CTT CAT TCC CTT ATT	480
Lys Arg Glu Val Lys Ser Tyr Leu Ile Glu Thr Leu His Ser Leu Ile	
145 150 155 160	
GAT AAT CTG TAT CCT GAA GAG AAG TTG GAC TGT GTT ATA GTA GTC TTC	528
Asp Asn Leu Tyr Pro Glu Glu Lys Leu Asp Cys Val Ile Val Val Phe	
165 170 175	
ATA GGA GAG ACA GAT ACT GAT TAT GTA AAT GGT GTT GTA GCC AAC CTG	576
Ile Gly Glu Thr Asp Thr Asp Tyr Val Asn Gly Val Val Ala Asn Leu	
180 185 190	
GAG AAA GAA TTT TCT AAA GAA ATC AGT TCT GGC TTG GTG GAA ATA ATA	624
Glu Lys Glu Phe Ser Lys Glu Ile Ser Ser Gly Leu Val Glu Ile Ile	
195 200 205	
TCA CCT CCT GAA AGC TAT TAT CCT GAC CTG ACG AAC TTA AAG GAG ACA	672
Ser Pro Pro Glu Ser Tyr Tyr Pro Asp Leu Thr Asn Leu Lys Glu Thr	
210 215 220	
TTT GGA GAT TCT AAA GAA AGA GTA AGA TGG AGA ACA AAG CAA AAC CTA	720
Phe Gly Asp Ser Lys Glu Arg Val Arg Trp Arg Thr Lys Gln Asn Leu	
225 230 235 240	
GAT TAT TGT TTT CTA ATG ATG TAT GCT CAG GAA AAA GGC ACA TAC TAC	768
Asp Tyr Cys Phe Leu Met Met Tyr Ala Gln Glu Lys Gly Thr Tyr Tyr	
245 250 255	

ATC CAG CTT GAA GAT GAT ATT ATT GTC AAA CAG AAT TAC TTT AAC ACC	816
Ile Gln Leu Glu Asp Asp Ile Ile Val Lys Gln Asn Tyr Phe Asn Thr	
260 265 270	
ATA AAG AAT TTT GCA CTT CAA CTT TCT TCT GAG GAA TGG ATG ATA CTT	864
Ile Lys Asn Phe Ala Leu Gln Leu Ser Ser Glu Glu Trp Met Ile Leu	
275 280 285	
GAG TTC TCC CAG CTG GGA TTC ATT GGT AAA ATG TTT CAA GCA CCT GAC	912
Glu Phe Ser Gln Leu Gly Phe Ile Gly Lys Met Phe Gln Ala Pro Asp	
290 295 300	
CTC ACT CTG ATT GTG GAA TTC ATA TTT ATG TTC TAT AAG GAG AAG CCC	960
Leu Thr Leu Ile Val Glu Phe Ile Phe Met Phe Tyr Lys Glu Lys Pro	
305 310 315 320	
ATC GAC TGG CTC TTG GAC CAT ATT CTG TGG GTC AAA GTC TGC AAC CCG	1008
Ile Asp Trp Leu Leu Asp His Ile Leu Trp Val Lys Val Cys Asn Pro	
325 330 335	
GAA AAA GAT GCA AAA CAC TGT GAT CGA CAG AAG GCA AAT CTG CGA ATT	1056
Glu Lys Asp Ala Lys His Cys Asp Arg Gln Lys Ala Asn Leu Arg Ile	
340 345 350	
CGT TTC AGA CCG TCC CTT TTC CAA CAC GTT GGT CTG CAT TCT TCA CTC	1104
Arg Phe Arg Pro Ser Leu Phe Gln His Val Gly Leu His Ser Ser Leu	
355 360 365	
ACA GGA AAA ATT CAG AAA CTC ACG GAT AAA GAT TAC ATG AAA CCA TTA	1152
Thr Gly Lys Ile Gln Lys Leu Thr Asp Lys Asp Tyr Met Lys Pro Leu	
370 375 380	
CTG CTC AAA ATC CAT GTA AAC CCC CCT GCA GAG GTA TCT ACT TCT TTG	1200
Leu Leu Lys Ile His Val Asn Pro Pro Ala Glu Val Ser Thr Ser Leu	
385 390 395 400	
AAG GTC TAC CAA GGT CAT ACA CTG GAG AAA ACT TAC ATG GGT GAG GAC	1248
Lys Val Tyr Gln Gly His Thr Leu Glu Lys Thr Tyr Met Gly Glu Asp	
405 410 415	
TTC TTC TGG GCT ATA ACC CCA GTA GCT GGA GAC TAC ATC CTA TTT AAA	1296
Phe Phe Trp Ala Ile Thr Pro Val Ala Gly Asp Tyr Ile Leu Phe Lys	
420 425 430	
TTC GAC AAG CCA GTC AAT GTG GAA AGT TAT TTG TTC CAT AGT GGC AAC	1344
Phe Asp Lys Pro Val Asn Val Glu Ser Tyr Leu Phe His Ser Gly Asn	
435 440 445	
CAG GAT CAT CCA GGG GAT ATT CTG CTC AAC ACA ACG GTG GAA GTT CTG	1392
Gln Asp His Pro Gly Asp Ile Leu Leu Asn Thr Thr Val Glu Val Leu	
450 455 460	
CCT TTG AAG AGT GAA GGT TTG GAC ATC AGC AAA GAA ACC AAA GAC AAA	1440
Pro Leu Lys Ser Glu Gly Leu Asp Ile Ser Lys Glu Thr Lys Asp Lys	
465 470 475 480	
CGA TTA GAA GAT GGC TAT TTC AGA ATA GGG AAA TTT GAA AAC GGT GTT	1488
Arg Leu Glu Asp Gly Tyr Phe Arg Ile Gly Lys Phe Glu Asn Gly Val	
485 490 495	
GCG GAA GGG ATG GTG GAT CCC AGC CTA AAC CCC ATT TCG GCC TTC CGA	1536
Ala Glu Gly Met Val Asp Pro Ser Leu Asn Pro Ile Ser Ala Phe Arg	
500 505 510	
CTT TCA GTT ATT CAG AAT TCT GCT GTT TGG GCC ATT CTT AAT GAG ATC	1584

Leu Ser Val Ile Gln Asn Ser Ala Val Trp Ala Ile Leu Asn Glu Ile
 515 520 525
 CAT ATT AAA AAA GTC ACA AAC TGA 1608
 His Ile Lys Lys Val Thr Asn ***
 530 535
 配列番号 : 3
 配列の長さ : 1 2 0 3
 配列の型 : 核酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の特徴 : G a l T 遺伝子 (ヒト由来)
 配列 :
 ATG AGG CTT CGG GAG CCG CTC CTG AGC GGC GCC GCG ATG CCA GGC GCG 48
 Met Arg Leu Arg Glu Pro Leu Leu Ser Gly Ala Ala Met Pro Gly Ala
 5 10 15
 TCC CTA CAG CGG GCC TGC CGC CTG CTC GTG GCC GTC TGC GCT CTG CAC 96
 Ser Leu Gln Arg Ala Cys Arg Leu Leu Val Ala Val Cys Ala Leu His
 20 25 30
 CTT GGC GTC ACC CTC GTT TAC TAC CTG GCT GGC CGC GAC CTG AGC CGC 144
 Leu Gly Val Thr Leu Val Tyr Tyr Leu Ala Gly Arg Asp Leu Ser Arg
 35 40 45
 CTG CCC CAA CTG GTC GGA GTC TCC ACA CCG CTG CAG GGC GGC TCG AAC 192
 Leu Pro Gln Leu Val Gly Val Ser Thr Pro Leu Gln Gly Gly Ser Asn
 50 55 60
 AGT GCC GCC GCC ATC GGG CAG TCC TCC GGG GAG CTC CGG ACC GGA GGG 240
 Ser Ala Ala Ala Ile Gly Gln Ser Ser Gly Glu Leu Arg Thr Gly Gly
 65 70 75 80
 GCC CGG CCG CCG CCT CCT CTA GGC GCC TCC TCC CAG CCG CGC CCG GGT 288
 Ala Arg Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ala Ser Ser Gln Pro Arg Pro Gly
 85 90 95
 GGC GAC TCC AGC CCA GTC GTG GAT TCT GGC CCT GGC CCC GCT AGC AAC 336
 Gly Asp Ser Ser Pro Val Val Asp Ser Gly Pro Gly Pro Ala Ser Asn
 100 105 110
 TTG ACC TCG GTC CCA GTG CCC CAC ACC ACC GCA CTG TCG CTG CCC GCC 384
 Leu Thr Ser Val Pro Val Pro His Thr Thr Ala Leu Ser Leu Pro Ala
 115 120 125
 TGC CCT GAG GAG TCC CCG CTG CTT GTG GGC CCC ATG CTG ATT GAG TTT 432
 Cys Pro Glu Glu Ser Pro Leu Leu Val Gly Pro Met Leu Ile Glu Phe
 130 135 140
 AAC ATG CCT GTG GAC CTG GAG CTC GTG GCA AAG CAG AAC CCA AAT GTG 480
 Asn Met Pro Val Asp Leu Glu Leu Val Ala Lys Gln Asn Pro Asn Val
 145 150 155 160
 AAG ATG GGC GGC CGC TAT GCC CCC AGG GAC TGC GTC TCT CCT CAC AAA 528
 Lys Met Gly Gly Arg Tyr Ala Pro Arg Asp Cys Val Ser Pro His Lys
 165 170 175
 GTG GCC ATC ATC ATT CCA TTC CGC AAC CGG CAG GAG CAC CTC AAG TAC 576
 Val Ala Ile Ile Ile Pro Phe Arg Asn Arg Gln Glu His Leu Lys Tyr
 180 185 190
 TGG CTA TAT TAT TTG CAC CCA GTC CTG CAG CGC CAG CAG CTG GAC TAT 624
 Trp Leu Tyr Tyr Leu His Pro Val Leu Gln Arg Gln Gln Leu Asp Tyr
 195 200 205

GGC ATC TAT GGC ATC TAT GTT ATC AAC CAG GCG GGA GAC ACT ATA TTC	672
Gly Ile Tyr Gly Ile Tyr Val Ile Asn Gln Ala Gly Asp Thr Ile Phe	
210 215 220	
AAT CGT GCT AAG CTC CTC AAT GTT GGC TTT CAA GAA GCC TTG AAG GAC	720
Asn Arg Ala Lys Leu Leu Asn Val Gly Phe Gln Glu Ala Leu Lys Asp	
225 230 235 240	
TAT GAC TAC ACC TGC TTT GTG TTT AGT GAC GTG GAC CTC ATC CCA ATG	768
Tyr Asp Tyr Thr Cys Phe Val Phe Ser Asp Val Asp Leu Ile Pro Met	
245 250 255	
AAT GAC CAT AAT GCG TAC AGG TGT TTT TCA CAG CCA CGG CAC ATT TCC	816
Asn Asp His Asn Ala Tyr Arg Cys Phe Ser Gln Pro Arg His Ile Ser	
260 265 270	
GTT GCA ATG GAT AAG TTT GGA TTC AGC CTA CCT TAT GTT CAG TAT TTT	864
Val Ala Met Asp Lys Phe Gly Phe Ser Leu Pro Tyr Val Gln Tyr Phe	
275 280 285	
GGA GGT GTC TCT GCT CTA AGT AAA CAA CAG TTT CTA ACC ATC AAT GGA	912
Gly Gly Val Ser Ala Leu Ser Lys Gln Gln Phe Leu Thr Ile Asn Gly	
290 295 300	
TTT CCT AAT AAT TAT TGG GCG TGG GGA GGA GAA GAT GAT GAC ATT TTT	960
Phe Pro Asn Asn Tyr Trp Gly Trp Gly Gly Glu Asp Asp Asp Ile Phe	
305 310 315 320	
AAC AGA TTA GTT TTT AGA GGC ATG TCT ATA TCT CGC CCA AAT GCT GTG	1008
Asn Arg Leu Val Phe Arg Gly Met Ser Ile Ser Arg Pro Asn Ala Val	
325 330 335	
GTC GGG AGG TGT CGC ATG ATC CGC CAC TCA AGA GAC AAA AAA AAT GAA	1056
Val Gly Arg Cys Arg Met Ile Arg His Ser Arg Asp Lys Lys Asn Glu	
340 345 350	
CCC AAT CCT CAG AGG TTT GAC CGA ATT GCA CAC ACA AAG GAG ACA ATG	1104
Pro Asn Pro Gln Arg Phe Asp Arg Ile Ala His Thr Lys Glu Thr Met	
355 360 365	
CTC TCT GAT GGT TTG AAC TCA CTC ACC TAC CAG GTG CTG GAT GTA CAG	1152
Leu Ser Asp Gly Leu Asn Ser Leu Thr Tyr Gln Val Leu Asp Val Gln	
370 375 380	
AGA TAC CCA TTG TAT ACC CAA ATC ACA GTG GAC ATC GGG ACA CCG AGC	1200
Arg Tyr Pro Leu Tyr Thr Gln Ile Thr Val Asp Ile Gly Thr Pro Ser	
385 390 395 400	
TAG	1203

【図面の簡単な説明】

【図1】N-結合型糖鎖の分岐構造形成過程において、GnT-IV、GnT-Vが触媒する反応を示す図である。

【図2】GalTの触媒する反応を示す図である。

【図3】アガラクトシルバイアンテナ糖鎖を示す図である。

【図4】プラスミド pCXH1の作製方法を示す図である。

【図5】GnT-V発現用プラスミド pCXH1-h GnT-Vの作製方法を示す図である。

【図6】GnT-IV発現用プラスミド pCXN2-b

GnT-IVの作製方法を示す図である。

【図7】GalT発現用プラスミド pCXN2-GalTの作製方法を示す図である。

【図8】V26/IV5株および各GalT強化株における、GnT-IV活性に対するGalT活性の相対値と、ヒトIFN-γの糖鎖におけるGnT-IV分岐鎖付加率の関係を示す図である。

【図9】分岐数の異なる糖鎖の構造の代表例を示す図である。

【符号の説明】

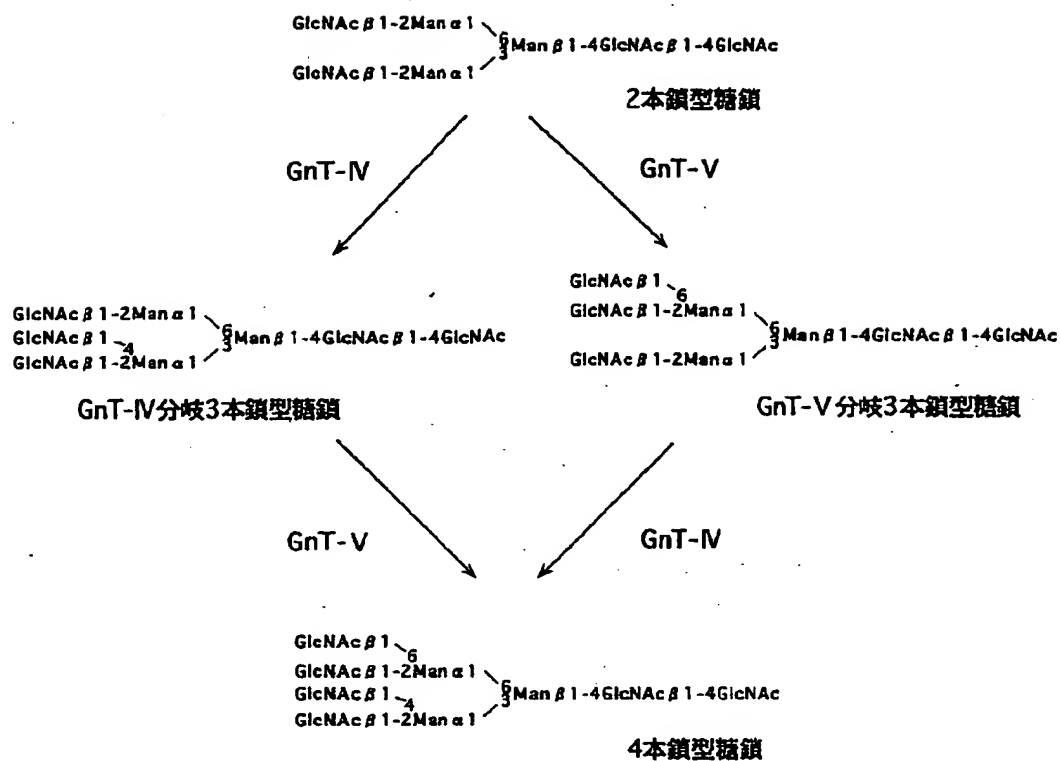
GlcNAc : N-アセチル-D-グルコサミン

Man : D-マンノース

G a l : D-ガラクトース
F u c : L-フコース

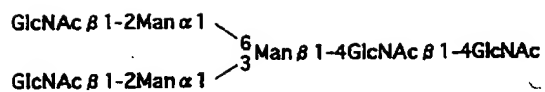
UD P : ウリジンニリン酸

【図 1】



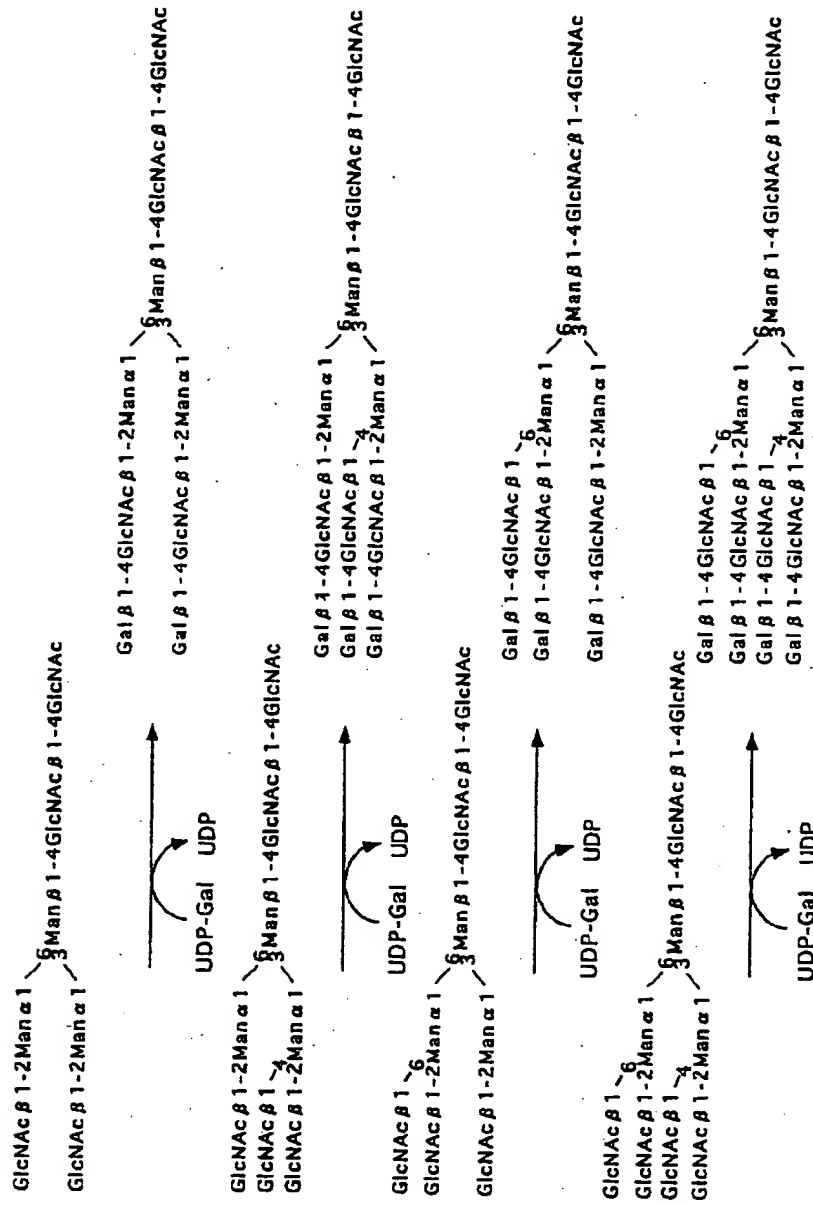
N-結合型糖鎖における分岐構造形成過程

【図 3】



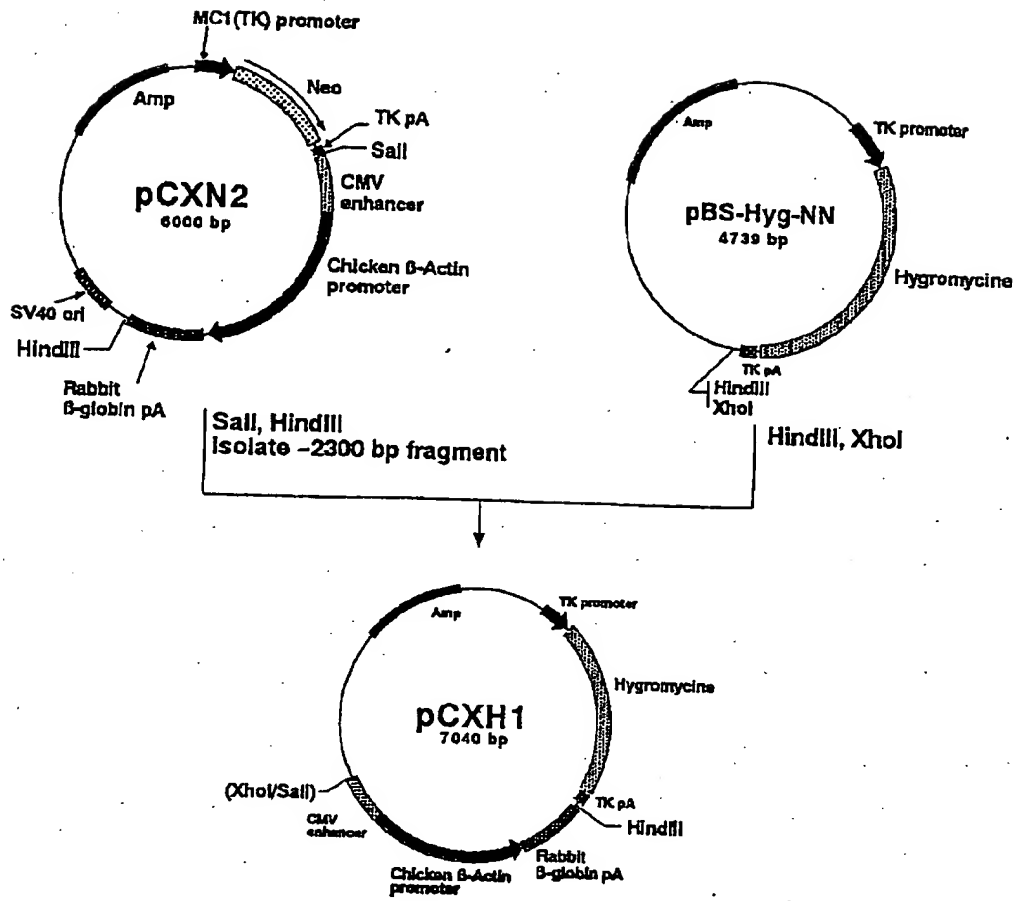
アガラクトシルバイアンテナ糖鎖

【図2】

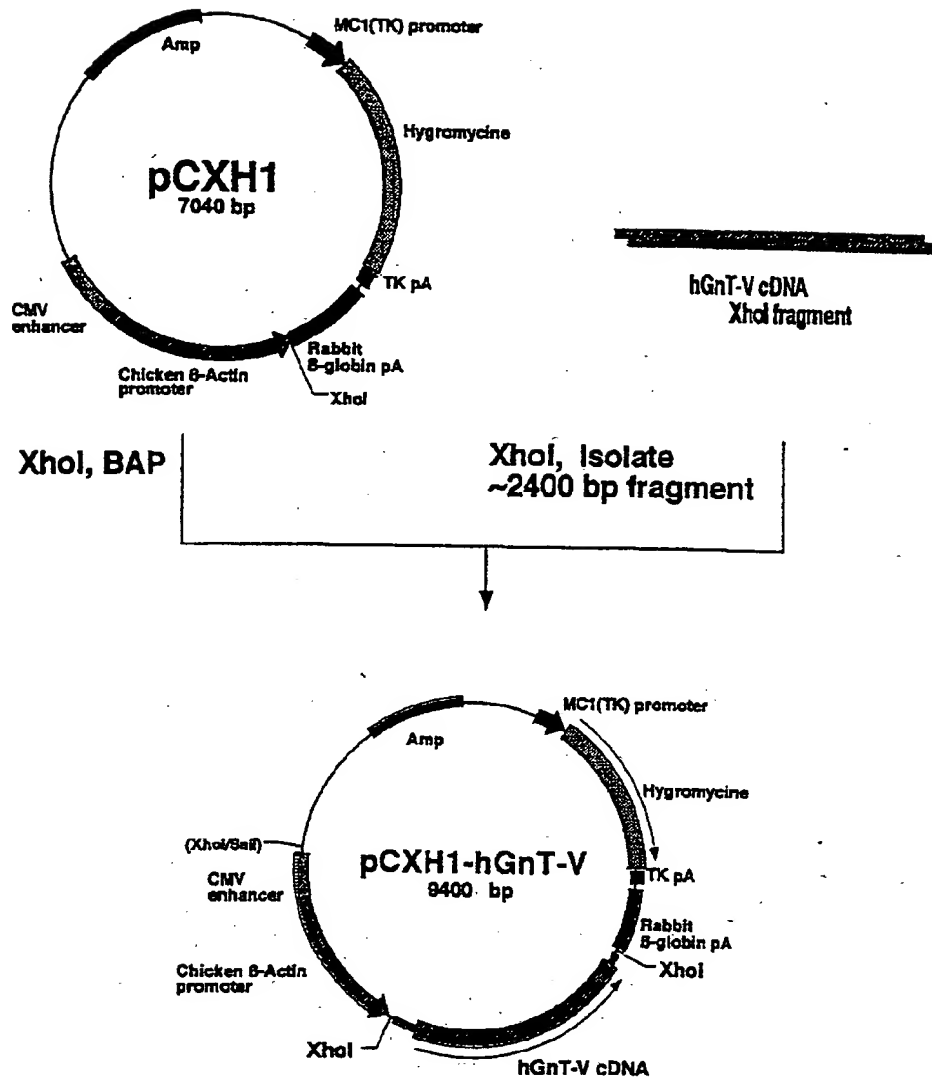


β -1,4-ガラクトース転移酵素 (GalT) の触媒する反応

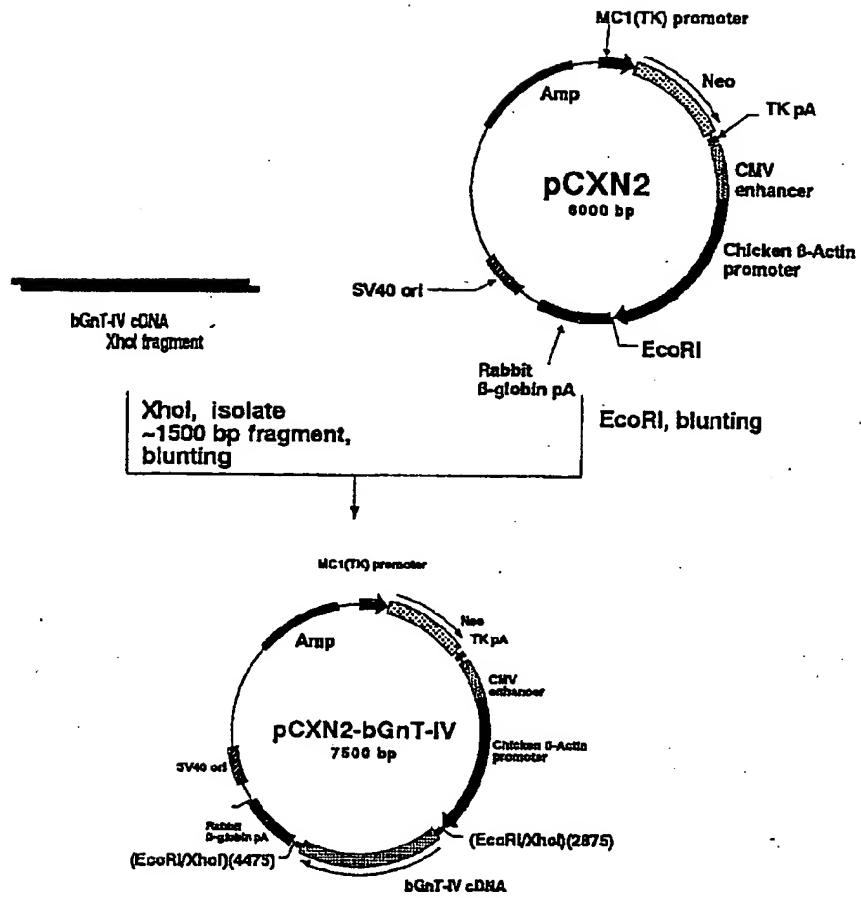
[4]



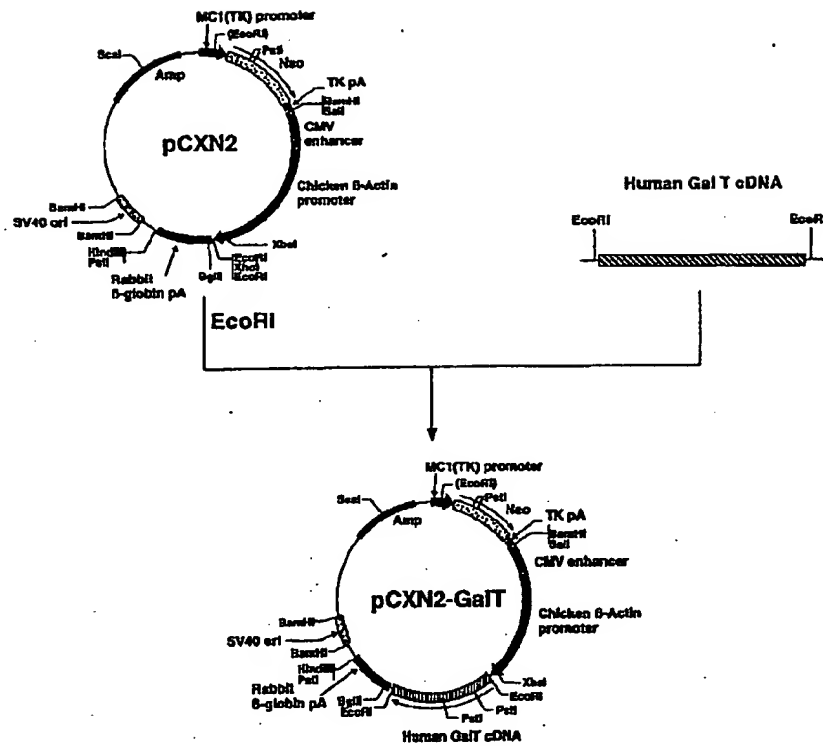
【図 5】



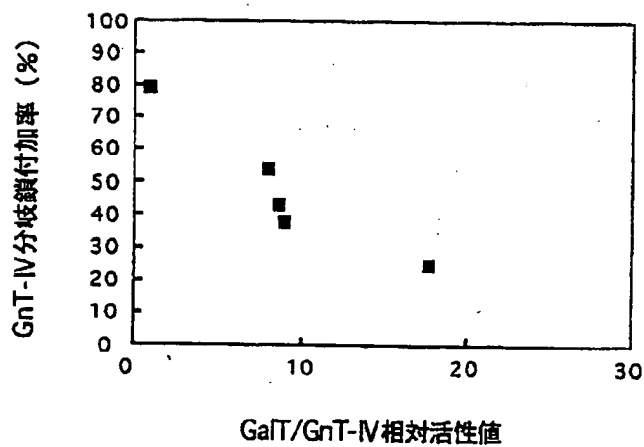
【図 6】



【図 7】



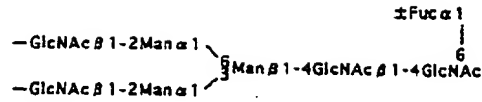
【図 8】



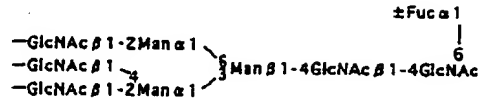
GnT-IV, V 高発現CHO株(V26/V5)にGalTを導入強化した株の
GalT/GnT-IV活性相対値と、IFN-γ糖鎖におけるGnT-IV分岐鎖付加率の関係

【図 9】

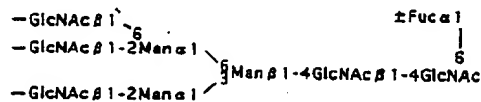
2本鎖型



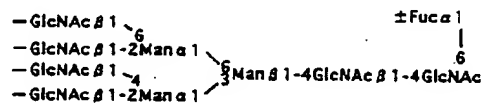
3本鎖(GnT-IV分岐)型



3本鎖(GnT-V分岐)型



4本鎖型



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/10		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:91)			
(72) 発明者 谷川 峰子	千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内	(72) 発明者 竹内 誠	神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟 麟麦酒株式会社基盤技術研究所内
(72) 発明者 榎野 正	千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内	F ターム (参考)	4B024 AA01 BA25 BA80 CA04 DA02 DA03 EA04 GA11 4B050 CC03 DD11 LL05 4B064 AG01 AG12 CA05 CA10 CA19 CC24 DA01 4B065 AA57X AA87X AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA26 CA44 4C084 AA01 AA06 AA07 BA34 BA44 DA24
(72) 発明者 箕輪 真理	神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟 麟麦酒株式会社基盤技術研究所内		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.